

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

„Charakterisierung von CEACAM1 in der Retina und Choroidea am Mausmodell“

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Jonathan Müller**

aus

**Bad Salzungen**

Würzburg, April 2022

1. Überarbeitung Juli 2022

**Referent/Referentin:** Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. B. Braunger

**Koreferent:** Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Ach

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 13.02.2023

**Der Promovend ist Arzt**

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomie des Auges .....	1
1.1.1	Anatomische Grundlagen .....	1
1.1.2	Gliazellen.....	5
1.2	Gefäßentwicklung im Mausauge .....	6
1.2.1	Vaskularisierung der Mausretina.....	7
1.3	CEACAM.....	8
1.3.1	CEACAM-Familie.....	8
1.3.2	CEACAM1 .....	9
1.3.3	CEACAM1 in der Angiogenese.....	10
1.4	TGF- $\beta$ .....	12
1.4.1	TGF- $\beta$ -Signalweg .....	13
1.4.2	Die Rolle von TGF- $\beta$ im Auge .....	13
1.5	Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden .....	15
2.1	Materialien .....	15
2.1.1	Reagenzienliste .....	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	16
2.1.3	Puffer.....	18
2.1.4	Enzyme und Kits.....	19
2.1.5	Verwendete Antikörper .....	19
2.1.6	Oligonukleotid-Primer für PCR.....	20
2.1.7	Oligonukleotid-Primer für RT-qPCR.....	20
2.1.8	Versuchstiere.....	21
2.1.8.1	Tierhaltung .....	21
2.1.8.2	Tierlinien .....	21

2.2	Methoden .....	21
2.2.1	Gewebeaufbereitung für die Histologie .....	21
2.2.2	Immunfluoreszenz .....	23
2.2.2.1	Immunhistochemische Färbungen.....	24
2.2.3	Licht- und Elektronenmikroskopie .....	26
2.2.3.1	Anfertigung von Semidünnschnitten .....	27
2.2.3.2	Anfertigung von Ultradünnschnitten.....	27
2.2.4	Morphometrische Analyse .....	28
2.2.5	Genotypisierung der Versuchstiere .....	28
2.2.6	Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR).....	29
2.2.7	Statistik.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Physiologische <i>Ceacam1</i> -Expression im Auge.....	34
3.2	Knockout-Nachweis von <i>Ceacam1</i> bei <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen .....	37
3.3	Morphologische und Morphometrische Analysen von <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen .....	39
3.4	IBA1 positive Zellen in der Retina von <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	43
3.5	Expression immunmodulierender Faktoren in <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen .....	44
3.6	Expression von Vertretern des TGF- $\beta$ -Signalweges in <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen .....	45
4	Diskussion .....	47
4.1	<i>Ceacam1</i> -Expression in Retina und Choroidea während der Entwicklung und .... im erwachsenen Tier .....	47
4.2	<i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse: Morphologie der Retina und Choroidea .....	48
4.3	<i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse zeigen eine Akkumulation IBA1 positiver, phagozytisch aktiver Zellen in subneuroretinalen Raum.....	49
5	Zusammenfassung .....	52
6	Literaturverzeichnis.....	53
	Appendix.....	
	I Abkürzungsverzeichnis .....	

II	Abbildungsverzeichnis .....
IV	Danksagung .....
V	Lebenslauf.....
VI	Eigene Kongressteilnahmen.....

## **1 Einleitung**

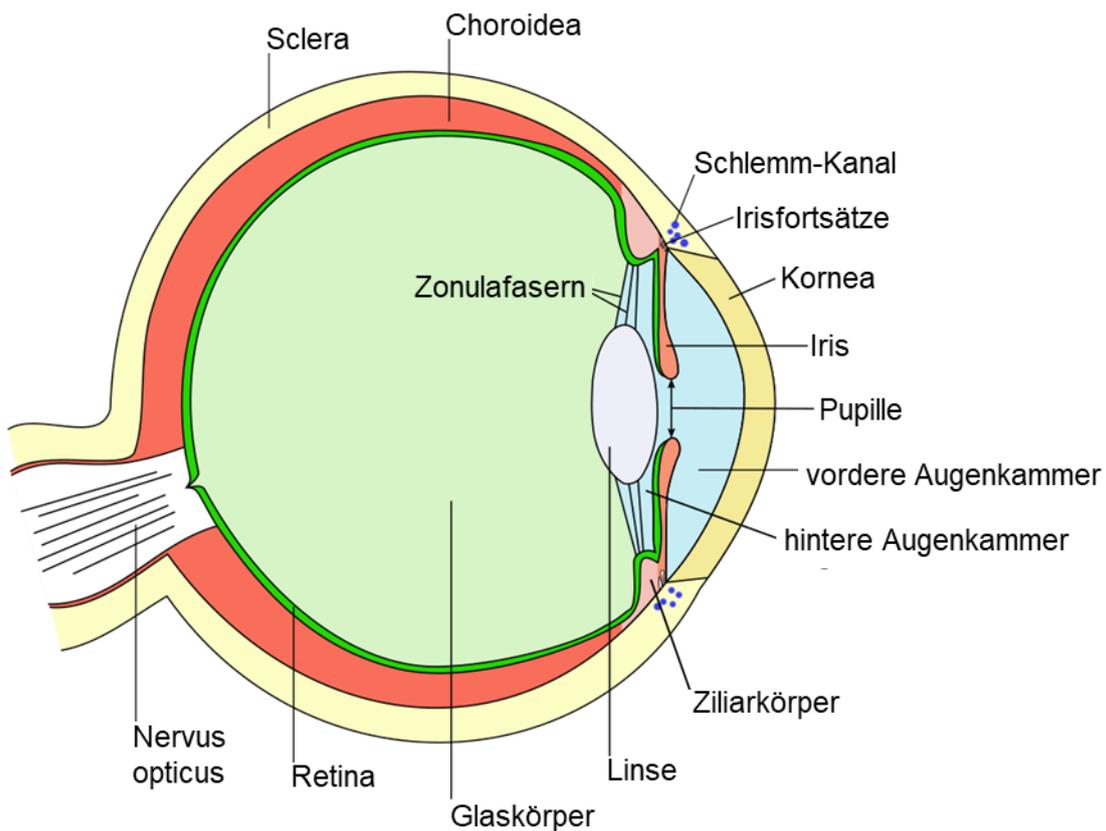
### **1.1 Anatomie des Auges**

#### **1.1.1 Anatomische Grundlagen**

Der Augapfel (Bulbus oculi) kann in 3 Schichten unterteilt werden. Die äußere Tunica fibrosa bulbi zeichnet sich durch ihre mechanische Stabilität aus. Sie besteht aus Sklera und Cornea (Abbildung (Abb.) 1) [1]. Die lichtbrechende Cornea ist frei von Gefäßen und wird durch Diffusion angrenzender Medien sowie über episklerale Gefäße aus dem Bereich des Limbus versorgt [2]. Damit ist das Stroma der Cornea gefäßfrei, zudem sind die Kollagenfibrillen des Stromas gleichmäßig angeordnet, was zur guten Durchsichtigkeit der Cornea führt [1]. Nach außen ist die Cornea durch ein unverhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel begrenzt [2]. Die Lamina limitans anterior (Bowman-Membran) trennt dieses vordere Epithel vom Stroma ab [2]. Zum Inneren hin wird das Stroma durch die Lamina limitans posterior (Descemet-Membran) abgeschlossen [2]. Dieser liegt ein einschichtiges Endothel mit Zonulae occludentes auf [2]. Die Sklera wird mit Blut über die Arteriae (Aa.) ciliares anteriores versorgt [2]. Sie lässt sich in drei Schichten unterteilen. Die äußere Lamina episcleralis mit lockerem Bindegewebe, die mittlere Lamina propria mit straffem Bindegewebe sowie die innere Lamina fusca, die aus lockerem Bindegewebe und Melanozyten besteht [1].

Die mittlere Schicht des Bulbus wird von der Tunica vasculosa bulbi gebildet, auch Uvea genannt [1]. Diese gefäßreiche Schicht besteht aus der Iris, dem Corpus ciliare, der Choroidea und der Bruch'schen Membran (Abb.1) [1]. Die Iris reguliert den Lichteinfall durch die Pupille mittels des Antagonismus des Musculus (M.) sphincter pupillae und M. dilatator pupillae [3]. Diese liegen im Stroma iridis, das zur Vorderseite von der Lamina epithelialis iridis und zur Rückseite vom Myoepithelium pigmentosum begrenzt wird [1]. Die Gefäßversorgung der Iris erfolgt über den Circulus arteriosus iridis major et minor aus den Aa. ciliares posteriores longae und Aa. ciliares anteriores [1, 2]. Der Corpus ciliare liegt zwischen der Iris und der Ora serrata (Abb.1). Er setzt sich aus einem Ziliarepithel, das zweischichtig ist und von beiden Seiten durch eine Basallamina begrenzt wird, zusammen [1, 3]. Zudem besteht er aus einem Stroma corporis ciliare, das mit Blutkapillaren durchzogen ist. Diese weisen ein fenestriertes Endothel zum besseren Stoffaustausch auf, denn der Ziliarkörper hat mit seinem Ziliarepithel die wichtige Funktion der Kammerwasserproduktion [1]. Im Corpus ciliare befindet sich weiterhin der glatte M. ciliaris, der zum einen den Kammerwasserabfluss und zum anderen über die Zonulafasern die Akkomodation der Linse reguliert [1, 2]. Den dritten Anteil der Tunica vasculosa bulbi bildet die Choroidea (Abb.1), die auch als

Aderhaut bezeichnet wird. Sie ist für die Ernährung des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Photorezeptoren verantwortlich, durch sie fließen 85% der das Auge erreichenden Blutmenge [1]. Zur nach außen angrenzenden Lamina fusca der Sclera grenzt sie mit ihrer Lamina suprachoroidea an [1]. Hier verlaufen die aus der Arteria (A.) ophthalmica stammenden Aa. ciliares posteriores longae et breves sowie die Aa. ciliares anteriores [1]. Diese Arterien gehen in der Lamina vasculosa in weitlumige Arteriolen über [2, 3]. Die dritte Schicht der Choroidea ist die Lamina choroidocapillaris, die mit ihren Kapillaren aus den Arteriolen der Lamina vasculosa versorgt wird [1]. Die Basallamina dieser fenestrierter Endothelzellen steht in Verbindung mit der angrenzenden Bruch'schen Membran [1, 2]. Letztere ist gefäßfrei und hat einen mehrschichtigen Aufbau bestehend aus dem Stratum elasticum, Stratum fibrosum und der Basallamina des retinalen Pigmentepithels [1]. Sie dient zur Aufrechterhaltung des intraokulären Drucks und der Des-Akkomodation [1].



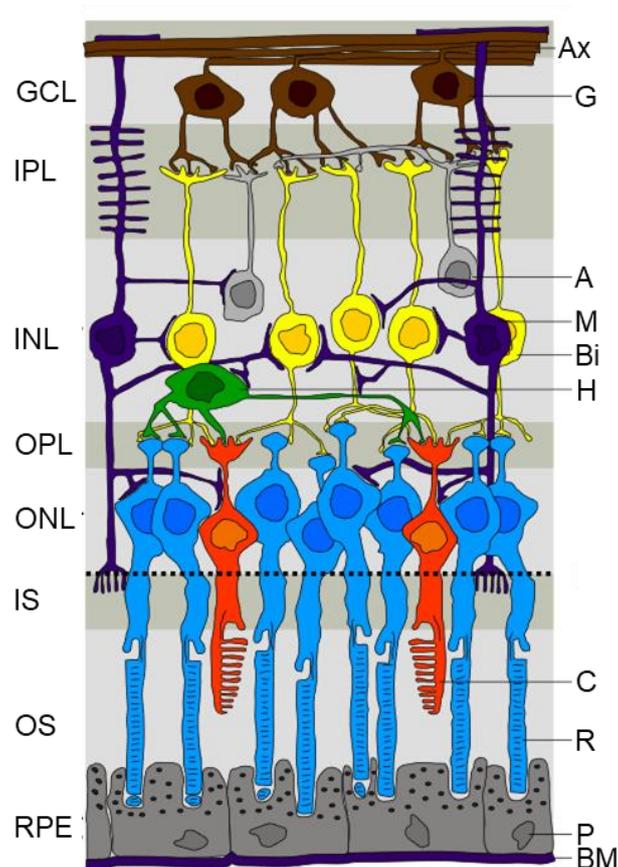
**Abb. 1: Aufbau des Auges im horizontalen Querschnitt.** Abbildung modifiziert nach [4], unterliegt einer freien Lizenz nach CC BY-SA 3.0

Die dritte Schicht des Bulbus oculi ist die Tunica interna bulbi, wobei es sich um die Retina handelt (Abb. 1). Sie besteht aus einer Pars optica und einer Pars caeca retinae

[2]. Die lichtempfindliche Pars optica kleidet den Augenhintergrund aus und geht an der Ora serrata in die nicht lichtempfindliche Pars caeca retinae über [2]. Beide Teile setzen sich aus einem inneren und äußeren Blatt zusammen [5]. Letzteres besteht bei beiden aus einem einschichtigen Stratum pigmentosum retinae [5]. Seine Zellen sind apikal miteinander über Zonulae occludentes und adherentes verbunden [1]. Das RPE im Bereich der Pars optica hat eine Vielzahl an Funktionen. Es dient dem Stoffaustausch zwischen der stark vaskularisierten Choroidea und den Photorezeptoren und Nervenzellen des Stratum nervosum [1]. Im apikalen Bereich der Zellen liegen Phagolysosomen, die mit einer weiteren Funktion assoziiert sind, denn das RPE führt eine kontinuierliche Phagozytose der Spitzenabschnitte der Außensegmente der Photorezeptoren durch, welche im Rahmen der Membranerneuerung abgestoßen werden [2]. Außerdem schützt es die Außensegmente vor Photooxidation [2] und regeneriert 11-cisRetinal, wobei es sich um das photoempfindliche Pigment des Rhodopsins handelt [1].

Das Stratum nervosum liegt dem RPE (Abb. 2) lose an und ist mit ihm nur im Bereich der Ora serrata und am Discus nervi optici verbunden [1]. Dieser Umstand kann dazu führen, dass sich die Retina leicht von ihrem Untergrund ablöst, es kommt zur Ablatio retinae [2, 6]. Die Retina als Ort der Aufnahme und Umwandlung eines Bildes in ein chemisches Signal beherbergt die ersten drei Neurone der Sehbahn und besteht insgesamt aus zehn Schichten (Abb. 2) [7]. Die äußerste Schicht grenzt an das RPE an und wird von den Außensegmenten der Photorezeptoren gebildet. Hier wird das Licht durch die Sinneszellen (Photorezeptoren) aufgenommen und im Rahmen der Phototransduktionskaskade in ein neuronales Signal umgewandelt [7]. Die Außensegmente stehen mit den Innensegmenten in Verbindung, in denen wichtige Prozesse der Proteinbiosynthese stattfinden [1]. Der Bereich des Übergangs der Innensegmente von Zapfen und Stäbchen zu den Perikarya der Photorezeptoren wird Stratum limitans externum genannt und durch die Fortsätze der Müller-Gliazellen gebildet [1]. Die Perikarya der Photorezeptoren, die das Stratum nucleare externum (englisch (engl.): outer nuclear layer, ONL) bilden, verzüngen sich nach innen zu Innenfasern [2]. Diese verdicken sich an ihren Enden zu Endknöpfen (Spherulen) bei den Stäbchen und Endkolben (Pedikel) bei den Zapfen, um im Stratum plexiforme externum (engl.: outer plexiform layer, OPL) über chemische Synapsen und gap junctions das Signal auf das zweite Neuron, die Bipolarzellen sowie auf Horizontalzellen zu übertragen [1, 2]. Die Perikarya der Bipolarzellen liegen im Stratum

nucleare internum (engl.: inner nuclear layer, INL), hier finden sich zudem die Perikarya von Horizontalzellen, Müller-Zellen und Amakrinzellen [2].



**Abb. 2: Aufbau und Zelltypen der Retina**

A = Amakrinzelle, Ax = Axon, Bi = Bipolarzelle, BM = Bruch'sche Membran, C = Zapfen, G = Ganglienzelle, GCL = Ganglienzellschicht, H = Horizontalzelle, INL = innere Körnerzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, IS = innere Segmente, M = Müller-Zelle, ONL = äußere Körnerzellschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, OS = äußere Segmente, P = Pigmentepithelzelle, R = Stäbchen, RPE = retinales Pigmentepithel, gepunktete Linie = Membrana limitans externa. Die Abbildung wurde nach Vorlage von [6] modifiziert und unterliegt einer freien Lizenz nach CC BY-SA 3.0.

Die Bipolarzellen übertragen das Signal der Photorezeptoren auf die nach zentral weiterziehenden Ganglienzellen [2]. Die Synapsen zu den Ganglienzellen und damit zum dritten Neuron der Sehbahn liegen im Stratum plexiforme internum (engl.: inner plexiform layer, IPL) [1]. Hier finden auch wieder synaptische Verbindungen mit Horizontalzellen und Amakrinzellen statt, die unter anderem der Modulation der Informationsverarbeitung dienen [1, 2]. Das Stratum ganglionicum (engl.: retinal ganglion cell layer, GCL) ist Ort der Perikarya der Ganglienzellen [1]. Außerdem finden sich hier aberrante Amakrinzellen [2]. Bei den Ganglienzellen handelt es sich um

multipolare Neurone, deren Axone das Stratum neurofibrarum (engl.: nerve fiber layer, NFL) bilden und radial Richtung Discus nervi optici ziehen [1]. Den Abschluss hin zum Corpus vitreum bildet das Stratum limitans internum, welches aus den Endfortsätzen der Müller-Zellen und einer Basalmembran besteht [2].

Die Axone der Ganglienzellen bilden den N. opticus (Abb.1) und werden nach Verlassen der Sklera von einer Myelinscheide durch Oligodendrozyten umgeben [2]. Die Axone ziehen durch das Chiasma opticum, wo die nasalen Fasern nach kontralateral kreuzen [2]. Die gekreuzten kontralateralen nasalen Fasern und die ipsilateralen temporalen Fasern korrespondieren im Tractus opticus und ziehen zum Corpus geniculatum laterale, wo die Umschaltung auf das 4. Neuron stattfindet [7]. Vom Corpus geniculatum gelangt das Signal über die Radiatio optica zu primären Sehrinde, der Area striata (Area 17) sowie zur sekundären Sehrinde (Area 18, 19) [7].

Das Auge ist ein wichtiger Bestandteil des visuellen Systems, welches Sehen ermöglicht, indem elektromagnetische Wellen der Wellenlängen 400 bis 750 Nanometer (nm) durch photochemische Prozesse in Erregung umgewandelt werden [5]. Dazu dienen zum einen die Stäbchen, die für das Dämmerungssehen verantwortlich sind, und zum anderen die Zapfen, die für das Tag- und Farbsehen bestimmt sind [2]. Diese Signale werden – wie oben beschrieben – über den Sehnerven sowie die Umschaltstationen und nachgeschaltete Abschnitte der Sehbahn an die primäre Sehrinde im Lobus occipitalis weitergeleitet [1].

### **1.1.2 Gliazellen**

In der Retina kommen neben den Neuronen der Sehbahn auch andere Zellen vor. Hierzu zählen unter anderem drei Typen von Gliazellen: Müller-Zellen, Astrozyten und Mikroglia (Abb.2) [2]. Müller-Zellen durchziehen die Retina radiär vom Stratum limitans externum bis zum Stratum limitans internum [3], wo sich ihre Endfüßchen an die Basallamina anlagern [2]. Ihre Zellkörper liegen im Stratum nucleare internum [3]. Durch ihre die Retina durchziehende Ausrichtung haben sie eine Vielzahl an möglichen Funktionen und Interaktionen. Zum einen sind sie an der Entwicklung neuer Gefäße beteiligt und umhüllen diese zugleich [8]. Es wird diskutiert, dass sie durch Interaktion mit Endothelzellen, welche mit ihren tight junctions die Blut-Retina-Schranke bilden, auch deren Permeabilität mitbeeinflussen [9]. Zum anderen dienen sie als Stützgerüst der Retina [2], regulieren den Stoffaustausch zwischen Neuronen und ihrer Umgebung und unterstützen somit die Entwicklung, das Überleben und den Informationsaustausch der Neuronen [10]. Hierbei ist von Bedeutung, dass sie sich an der Aufnahme von

Neurotransmittern – insbesondere von Glutamat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) – aus dem Extrazellularraum rund um den synaptischen Spalt beteiligen [11]. Folglich tragen sie zur Aufrechterhaltung der Homöostase und damit unter anderem zu der Regulation der basalen Glutamat-Konzentration bei [12]. Im Falle einer Schädigung der Retina kommt es zu einer reaktiven Müller-Zell-Gliose. Hierbei schützen die Müller-Zellen die Neuronen zum einen, führen aber auch zu einer Neurodegeneration durch eine gestörte Sekretion neuroprotektiver Substanzen [10].

Die Mikroglia sind spezielle Makrophagen des zentralen Nervensystems, die bereits in der Fetalzeit einwandern und sich postnatal zu großen Teilen aus diesem Reservoir mittels Mitose vermehren [3]. Sie sind physiologisch in drei Schichten der Retina lokalisiert. Hierbei handelt es sich gleichzeitig um die drei Schichten, in denen die Gefäßplexus der Retina liegen (Stratum nucleare internum et externum, Stratum ganglionare) [13]. Mikroglia können in zwei verschiedenen Formen vorkommen, abhängig von ihrem Aktivitätszustand. Ruhende Mikroglia erscheinen ramifiziert, sie haben dünne, verzweigte Ausläufer und ihr Zellkörper sind klein [3]. Hingegen kann man aktivierte Mikroglia als amöboid, mit plumpen Ausläufern beschreiben [3]. In dieser reaktiven Form gehen sie verschiedenen Funktionen nach. Allem voran als spezielle Makrophagen des ZNS der Phagozytose von Zellresten [2], sodass sie vermehrt bei entzündlichen Prozessen und Erkrankungen des ZNS vorkommen [3]. Außerdem sezernieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die sich auf Angiogenese, Gliogenese und Axonentwicklung auswirken [2]. Die dritte Form von Gliazellen in der Retina sind die Astrozyten. Sie kommen vor allem im Stratum neurofibrarum vor, wo sie die Axone der Ganglienzellen begleiten [2]. Die wesentliche Funktion von Astrozyten ist die Stützfunktion, um dem Nervengewebe Struktur zu verleihen [3]. Außerdem bilden sie sich um Blutgefäße aus, wo sie in der Entwicklung des oberflächlichen Gefäßplexus wesentlich mitwirken und zum anderen über ihre Ausläufer mit den Endothelzellen in Kontakt stehen, wodurch sie die Dichtigkeit der Blut-Retina-Schranke mitbeeinflussen [7].

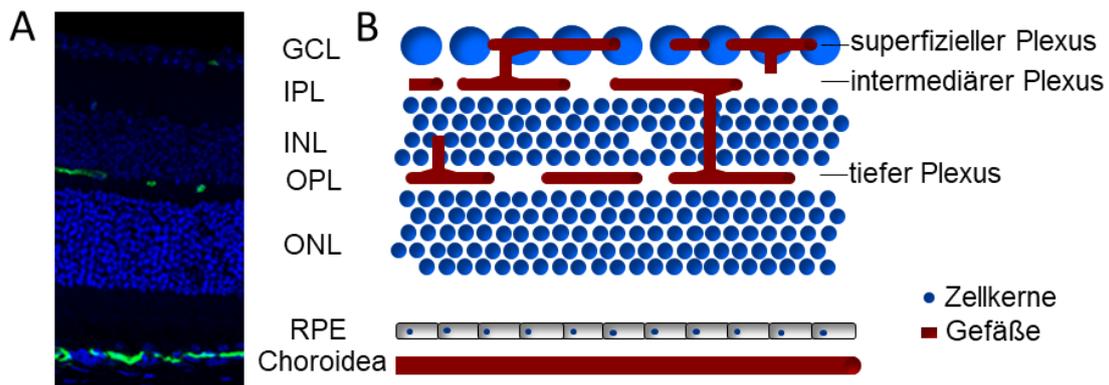
## **1.2 Gefäßentwicklung im Mausauge**

Im Auge der Maus beginnt die Vaskularisierung der Neuroretina im Gegensatz zum humanen Auge nicht pränatal, sondern erst am postnatalen Tag (P) 0, und dauert bis P21. Dabei entstehen 3 miteinander verbundene Gefäßplexus, welche den inneren Teil der Retina versorgen (Abb. 3). Der äußere Teil der Retina mit den Photorezeptoren

wird hingegen durch die Gefäße der Choroidea, die bereits pränatal entwickelt werden, ernährt [3].

### **1.2.1 Vaskularisierung der Mausretina**

Am P0 erscheinen ausgehend von der A. centralis retinae die ersten Gefäßsprossen um die Papille [14]. Die Gefäße wandern über die innere Oberfläche der Retina bis zur Ora serrata, die sie um den 7. bis 10. postnatalen Tag erreichen [14-17]. Dabei liegt dieser primäre, oberflächliche Gefäßplexus im Stratum neurofibrarum (Abb. 3) [16]. Dieser Prozess wird maßgeblich durch molekulare Faktoren, welche von Astrozyten sezerniert werden, gefördert und geleitet. Bedingt durch die Hypoxie in den avaskulären Arealen, kommt es zur Stabilisierung des Hypoxiefaktors hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 $\alpha$ ) und nachgeschaltet zur Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF). Astrozyten sezernieren unter anderem VEGF und leiten so das Wachstum der aussprossenden Gefäße in Bereiche mit niedriger Sauerstoffversorgung. Im Verlauf der fortschreitenden Vaskularisierung sinkt die VEGF/HIF1a-Konzentration wieder ab [15]. Von dem primären, oberflächlichen Plexus sprossen ab P7 neue Gefäße in die Tiefe der Retina aus [16, 17]. Sie werden dabei nicht mehr durch die Astrozyten geleitet, sondern von Müller-Zellen unterstützt [15]. Auch hier wird der Prozess der Gefäßentwicklung maßgeblich durch die Sekretion von VEGF durch die Müller-Zellen gesteuert. Im Verlauf sinken die VEGF-Konzentrationen wieder in den vaskularisierten Bereichen [15]. Zunächst ziehen diese Gefäße bis in die äußere plexiforme Schicht, wo sie den zweiten Plexus – parallel zum primären oberflächlichen Plexus – ausbilden (Abb. 3) [15, 17]. Er erstreckt sich etwa um P12 bis in die Peripherie der Retina [17]. Der dritte und sogenannte intermediäre Plexus entsteht abschließend durch vertikale Aussprossung im Bereich der inneren plexiformen Schicht [15] und erreicht seine finale Ausdehnung um den 12. bis 15. postnatalen Tag (Abb. 3) [17]. Diese neu entstandenen Gefäße der drei Plexus zeigen sich zunächst als polygonal ausgerichtete Kapillarnetze [16]. Ihre Ausreifung beginnt ab P10, im Zuge dessen bilden sich reife Gefäße als Arterien, Arteriolen, Venen und Venolen aus [16]. Dieser Prozess ist gleichzeitig mit dem unter anderem durch Perizyten gesteuerten Abbau bestehender unreifer Gefäße verbunden [16]. Somit ist zum Ende der dritten postnatalen Woche das Gefäßnetz vollständig ausgebildet (Abbildung 3) [17].



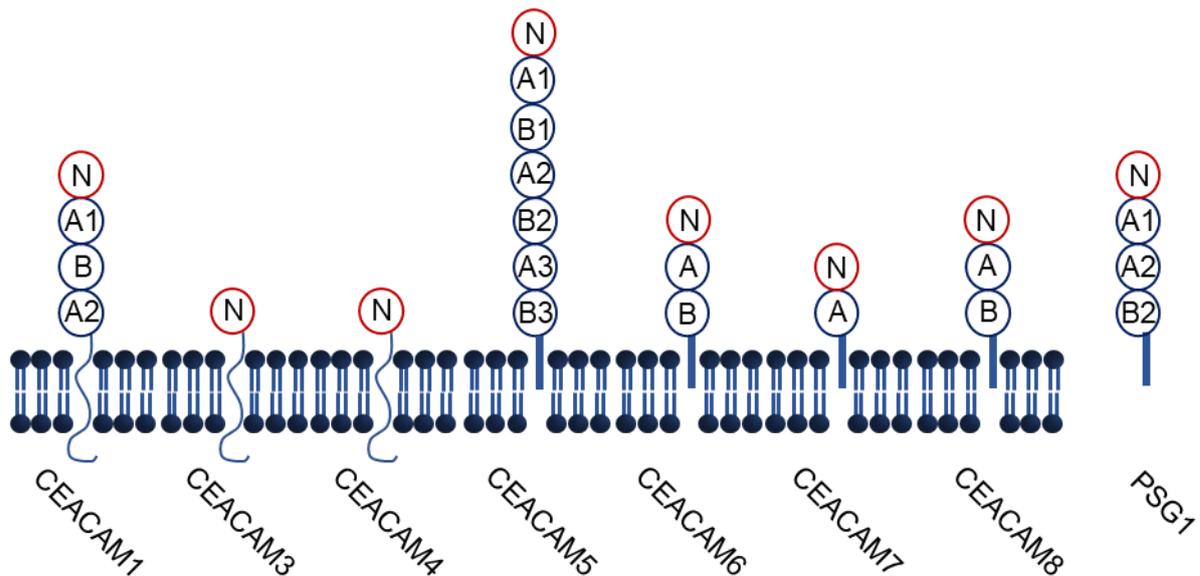
**Abb. 3: Gefäßplexus der Retina und Choroidea.**

A: FITC-Dextran-Perfusion (hellgrün) und Dapi-Färbung (Zellkerne - blau) eines retinalen Schnittes (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Braunger). Die Gefäße werden durch die Perfusion mit FITC-Dextran in der Immunfluoreszenz hellgrün dargestellt. B: Schematische Darstellung der retinalen Schichtung mit Lokalisation der Gefäßplexus. In der Ganglienzellschicht befindet sich der superfizielle Plexus, der über radiär ausgerichtete Gefäße in Verbindung mit dem intermediären Gefäßplexus steht, welcher in der inneren plexiformen Schicht zu liegen kommt. Dieser ist wiederum über aussprossende Gefäße mit dem tiefen Plexus in der äußeren plexiformen Schicht verbunden. Der äußere Teil der Retina wird per Diffusion über die Gefäße der Choroidea versorgt. A/B: GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerzellschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, RPE = retinales Pigmentepithel.

### 1.3 CEACAM

#### 1.3.1 CEACAM-Familie

Die Gruppe der Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) ist ein Teil der Immunglobulin-Superfamilie. Die verschiedenen Isoformen der CEA-Familie werden sowohl als membranär G-Protein gekoppelte als auch als transmembranäre Proteine exprimiert [18, 19]. Eine Übersicht der verschiedenen Isoformen ist in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4: Übersicht der Mitglieder der CEACAM-Familie.**

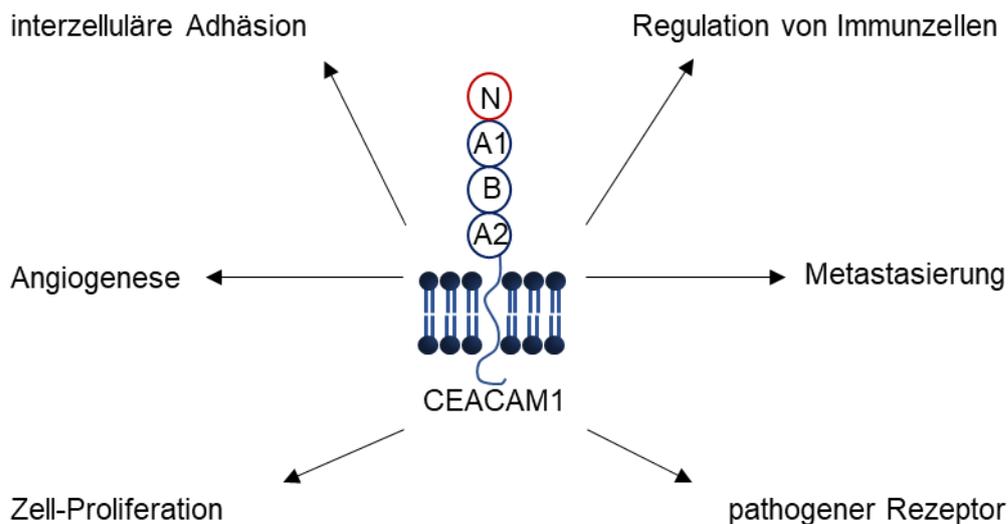
Die Vertreter setzen sich aus einem extrazellulären Anteil, welcher aus einer variablen Anzahl von A- und B-Domänen besteht und an seinem Ende eine N-Domäne bindet, zusammen. Diese extrazellulären Anteile sind entweder über eine transmembrane Domäne (CEACAM1/3/4) mit dem intrazellulären Teil verbunden oder über einen Membrananker (CEACAM5/6/7/8) an der Zelloberfläche fixiert. Die Abbildung orientiert sich in ihrem Aufbau und Inhalt an einer Vorlage von F. Kleefeldt [20].

### 1.3.2 CEACAM1

CEACAM1 ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül der CEACAM-Familie, das in den verschiedensten Geweben exprimiert wird [21]. CEACAM1 besteht aus einem extrazellulären Anteil, der mit einem Amino-Ende sowie einer variablen Anzahl (1-4) von Aminosäure-Bausteinen ausgestattet ist. Über einen transmembranären Anker ist dieser mit dem intrazellulär liegenden Anteil verbunden. Dieser zytoplasmatische Anteil von CEACAM1 kann in seiner Länge variieren. Man unterscheidet eine kurze (short -S) und eine lange (long -L) zytoplasmatische Aminosäurenkette. [18, 21-23] Der extrazelluläre Anteil ermöglicht sowohl trans-homophile [24] als auch trans-heterophile Interaktionen mit zum Beispiel CEACAM5, CEACAM6, CEACAM8 [23, 25-27]. Über Interaktionen an der Zelloberfläche kommt es zur Regulation intrazellulärer Signale [28]. Der lange zytoplasmatische Anteil von CEACAM1-L kann über dort befindliche Seronin-, Threonin- und Tyrosin-Anteile phosphoryliert werden und somit in die intrazelluläre Signaltransduktion über Aktivierung von zum Beispiel Tyrosin-abhängigen Kinasen der Src-Kinase Familie einwirken [29, 30].

Die Expression von CEACAM1 erfolgt in verschiedensten Geweben und Zellen. Hierzu zählen angiogen aktive Endothelzellen, Hepatozyten, Immunzellen, Zellen kolorektaler

Adenokarzinome und Epithelzellen der Prostata [31-36]. Dementsprechend vielfältig sind auch die ihm zugeschriebenen Funktionen, welche in Abb. 5 beispielhaft zusammengefasst sind. Hierzu zählen unter anderem die Einflussnahme auf die Angiogenese als pro-angiogener Faktor, auf die Zell-Proliferation sowie die interzelluläre Adhäsion als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül. Das Mitwirken an diesen Prozessen zeigt sich dabei in der veränderten CEACAM1-Expression im Rahmen der Tumorgenese und Metastasierung [18].



**Abb. 5: Auswahl an Funktionen von CEACAM1.**

Des Weiteren ist es als transmembranäres Protein mit einer extrazellulären Domäne an der Adhäsion und darauffolgenden Internalisation pathogener Faktoren – wie zum Beispiel *Helicobacter pylori* – beteiligt [37] und kann die Immunreaktion durch Interaktion mit T-Zellen und B-Zellen modulieren [35, 38].

### 1.3.3 CEACAM1 in der Angiogenese

Viele Publikationen haben die bedeutende Rolle von CEACAM1 im Prozess der Angiogenese untersucht und bestätigt [32, 33, 39]. Ergün S. et al. 2000 [40] konnten zeigen, dass CEACAM1 die Proliferationsrate von Endothelzellen positiv beeinflusst und die dreidimensionale Ausrichtung von Endothelzellen, also die Migration – hin zu röhrenförmigen Gefäßen – stimuliert. So hat CEACAM1 einerseits einen direkten chemotaktischen Effekt auf die Endothelzellen selbst, andererseits wirkt es indirekt durch ein CEACAM1-induziertes, vermehrtes Ansprechen der Endothelzellen auf die chemotaktischen Reize von VEGF<sup>165</sup>. Es zeigt sich, dass CEACAM1 und VEGF<sup>165</sup> in enger Verbindung im Rahmen der Angiogenese stehen. So kommt es auch im Umkehrschluss zur vermehrten CEACAM1-Expression in Endothelzellen vermittelt

durch VEGF<sup>165</sup> [32]. Die Expression von CEACAM1 ist vor allem in kleinen – sich im Reifeprozess befindlichen – Gefäßen mit hoher angiogenetischer Aktivität nachweisbar, die an der VEGF-vermittelten Gefäßneubildung beteiligt sind, hingegen nicht in adulten, reifen Gefäßen [33]. So konnte auch von Kilic N. et al. 2005 [33] gezeigt werden, dass es durch eine Überexpression von CEACAM1 in Endothelzellen zu einer vermehrten Ausschüttung von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF, Angiogenin, Angiopoetin-1/-2 und Interleukin-8 kommt sowie zur verminderten Expression inhibitorischer Modulatoren wie zum Beispiel Endostatin. Aber auch über die initialen Schritte der Angiogenese hinaus fungiert CEACAM1 als wichtiger Modulator in der Homöostase von Gefäßen. Es dient zum einen zur Stabilisierung von bereits bestehenden Blutgefäßen [41], gleichzeitig aber auch als Modulator im Rahmen von Umbauprozessen [30, 42]. Ein weiterer, wichtiger Punkt, an dem CEACAM1 mitwirkt, ist die Integrität der endothelialen Permeabilität. Entsprechend konnte von Najjar S. M. et al. 2013 [39] als auch Nouvion A. L. et al. 2010 [43] gezeigt werden, dass es in *Ceacam1*<sup>-/-</sup> (*Cc1*<sup>-/-</sup>)-Mäusen zu einer endothelialen Dysfunktion mit verminderter eNOS-Expression und vermehrter Leukozytenadhäsion am Endothel kommt. Dies führte im Weiteren zur erhöhten Aktivierung proinflammatorischer Signalwege über Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen (NF $\kappa$ B), was in einer endothelialen Barriestörung mündete. Im Zuge dessen stellten sich Veränderungen in der Morphologie der Endothelzellen im Vergleich zum Wildtyp dar, so waren eher rundliche, statt elongierte Endothelzellen zu erkennen, was unter anderem auf eine Veränderung in der interzellulären Adhäsion schließen lässt [39]. Einen Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion zeigte sich auch in der Arbeit von Nouvion A. L. et al. 2010 [43], wobei ein gestörter interzellulärer Kontakt mit lockeren und irregulären Adhäsionen sowie transzellulär liegenden Vesikeln beobachtet werden konnte. Jedoch wiesen *Cc1*<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Veränderungen in der allgemeinen Gefäßausbreitung und im Gefäßmuster gegenüber den Wildtypen auf. Daher kann von einer nicht beeinträchtigten Vaskulogenese ausgegangen werden [43].

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeit von P. Ludewig [44, 45], welche wichtige Erkenntnisse zur Rolle von CEACAM1 in der Gefäßentwicklung in der Retina lieferte. So zeigte sich hier im Vergleich von wildtypischen B6.-Mäusen mit transgenen B6.*Cc1*<sup>-/-</sup>-Tieren, dass es sowohl keinen Unterschied in der Ausbildung eines primären Gefäßplexus, als auch in der weiteren Differenzierung und Reifung der Gefäße hin zu adulten, reifen Arterien und Venen gibt [44]. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit kein

Unterschied in der Gefäßdichte zwischen den beiden untersuchten Tierlinien festgestellt werden. Außerdem wurden die Auswirkungen hyper- und hypoxischer Zustände, wie sie im Rahmen einer Frühgeborenen Retinopathie (engl.: retinopathy of prematurity, ROP) auftreten, am ROP-Modell untersucht. Hierbei ergaben sich Hinweise eines vermehrten Untergangs von Gefäßen, einer gehemmten Reifung der juvenilen Arterien und Venen und einer reduzierten Revaskularisation unter darauffolgenden normoxischen Bedingungen bei den untersuchten B6.Cc1<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber den wildtypischen Kontrollen [44, 45]. Daher ist von einem verbesserten Remodelling in Anwesenheit von CEACAM1 auszugehen [44, 45].

Neben den beschriebenen Interaktionen von CEACAM1 mit VEGF und anderen proangiogenen Faktoren also auch inhibitorischen Modulatoren der Angiogenese, können auch weitere Interaktionen im Rahmen des breiten Einflussgebietes von Vertretern der CEACAM-Familie beobachtet werden. Hierzu zählen auch die Einflüsse von Mitgliedern der transforming growth factors beta (TGF $\beta$ )-Familie auf die Expression und Sekretion von CEACAMs vor allem im Zusammenhang mit kolorektalen Adenokarzinomen [46, 47].

#### **1.4 TGF- $\beta$**

Die TGF- $\beta$ -Familie ist eine Gruppe von Zytokinen, die eine multifunktionale Rolle in der Homöostase des Organismus einnehmen. Es wurden bisher 33 humane Mitglieder dieser Polypeptid-Familie nachgewiesen. Neben den 3 Isoformen TGF- $\beta$ 1, -  $\beta$ 2 und -  $\beta$ 3 gehören Activine, Nodal, BMPs (bone morphogenetic proteins) sowie GDFs (Growth and differentiation fact) dazu [48-50].

Sie erfüllen eine Vielzahl an verschiedensten Funktionen in unterschiedlichen Geweben. Hierzu zählen die Regulation der embryonalen Entwicklung, die Zell-Zyklus-Kontrolle, die Organisation extrazellulärer Matrix, Angiogenese, Hämatopoese, Chemotaxis und Funktionen in Zusammenhang mit dem Immunsystem [51-56]. Dabei lassen sich jedoch sowohl wachstumsstimulierende als auch -inhibierende Effekte erkennen [57, 58]. So spielt TGF- $\beta$  eine bedeutende Rolle im Kontext der Apoptose in verschiedenen Zelltypen, wie zum Beispiel in der Leber [59], im Immunsystem [60, 61] und in reproduktiven Organen [62]. Außerdem wirkt es auf apoptotische Prozesse beim Remodelling von Geweben ein [63] und beeinflusst den ontogenetischen Zelltod im zentralen Nervensystem [64, 65].

Wie bereits zuvor beschrieben sind zudem Interaktionen des TGF- $\beta$ -Signalweges mit CEACAMs publiziert worden. [46, 47, 66]. In der Arbeit von Li et al. 2010 [67] konnte hierzu zunächst eine Colokalisation von CEA und transforming growth factors beta receptor 1 (TGF- $\beta$ -RI) festgestellt werden. In deren Folge konnte eine verstärkte Bindung von TGF- $\beta$ -RI durch CEA beobachtet werden, die bei einer Überexpression von CEA zu inhibitorischen Effekten auf die Signalkaskade der TGF- $\beta$ -Familie führte [67]. Somit werden die Funktionen des Tumorsuppressors TGF- $\beta$  [68] gestört, worauf eine ungebremsten Zellproliferation folgt [67].

#### **1.4.1 TGF- $\beta$ -Signalweg**

Die Signaltransduktion von extrazellulär lokalisierten TGF- $\beta$ -Liganden nach intrazellulär erfolgt über die Bindung an den transmembranären TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ II (TGF- $\beta$ -RII), welche wiederum zu einer Phosphorylierung von TGF- $\beta$ -RI führen [49, 51]. Hierbei handelt es sich um 2 Seronin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, welche im aktivierten Zustand einen Komplex bilden, der intrazellulär zur Aktivierung von R-Smads (Smad2 und 3) führt [51, 69-71]. Diese wiederum bilden zusammen mit Co-Smad4 einen Komplex, welcher in den Nucleus der Zelle wandert, um dort an Promotorregionen (Smad-binding-element) der DNA zu binden und die Transkription von Zielgenen zu initialisieren [69]. Die inhibitorisch wirkenden SMADs, SMAD6 und Smad7 vermitteln ihren Effekt auf den TGF- $\beta$ -Signalweg mittels Ubiquitinligasen Smurf1 und Smurf sowie Phosphatase-I [69, 70]. Des Weiteren können Smad6 und Smad7 durch Komplexbildung mit R-Smads und Co-Smads diese direkt blockieren [49, 50, 69-71].

Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie beeinflussen auch andere Signalwege, wie den PI3K-Akt-Signalweg sowie den mitogen-associated-protein (MAP)-Signalweg [48]. Insgesamt lässt sich feststellen, dass der komplexe Prozess des Zusammenwirkens dieser vielen verschiedenen Faktoren des TGF- $\beta$ -Signalwegs durch die Dauer der Bindung am Rezeptor, mittels negativer Feedback-Loops sowie durch die Konzentration der einzelnen Faktoren des Signalwegs, aber auch durch das Einwirken anderer Signalwege reguliert wird [72].

#### **1.4.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ im Auge**

Im hinteren Augenabschnitt, auf den sich diese Arbeit fokussiert, werden die verschiedenen TGF- $\beta$ -Isoformen von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Die TGF- $\beta$ 1 Expression lässt sich dabei sowohl im Gefäßendothel, den Perizyten, als auch in Mikroglia, Ganglienzellen und Photorezeptoren nachweisen [73, 74]. Zusammen mit TGF- $\beta$ 2 wird es vom RPE sekretiert [75, 76]. TGF- $\beta$ 3 ist hingegen in Müller-Zellen und

Mikroglia sowie in den Mitochondrien von Photorezeptoren nachweisbar [73, 74]. Die zur Bindung dieser Liganden notwendigen TGF- $\beta$ -RII sind sowohl zentral als auch peripher in der Ganglienzellschicht der Retina und damit auf den Ganglienzellen nachzuweisen [77, 78]. Ebenso finden sie sich in der inneren plexiformen Schicht [78].

Im Bereich des hinteren Augenabschnittes wurde von unserer Arbeitsgruppe und anderen gezeigt, dass durch den TGF- $\beta$ -Signalweg die Stimulation und Proliferation von Endothelzellen in der Choroidea reguliert wird [79, 80], was zum Einwachsen von choroidalen Gefäßen in den subretinalen Raum führen kann. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe darlegen, dass der TGF- $\beta$ -Signalweg retinale Neurone vor dem programmierten Zelltod schützt [77].

### **1.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war einerseits eine Charakterisierung der *Ceacam1*-Expression in Retina und Choroidea bei wildtypischen Mäusen. Hierzu erfolgten Untersuchungen sowohl an frühen postnatalen Entwicklungszeitpunkten, als auch in adulten Tieren nach abgeschlossener Angiogenese. Es wurden im Zuge dessen zum einen immunhistochemische Färbungen zur Bestimmung des genauen Zelltyps der CEACAM1-Expression verwendet, zum anderen mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die quantitative *Ceacam1*-Expression in Retina und Choroidea bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Auswirkung einer CEACAM1-Depletion mittels *Ceacam1*-Knockout-Mäusen (im Folgenden als *Cc1<sup>-/-</sup>* bezeichnet) auf die Morphologie von Retina und Choroidea genauer untersucht werden. Hierzu wurde mittels immunhistochemischer Färbungen und quantitativer RT-PCR zunächst die Deletion von *Ceacam1* bestätigt. Anschließend wurde an Semidünnschnitten ein möglicher Einfluss auf die Morphologie von Retina und Choroidea untersucht und mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen die Integrität der Bruch'schen Membran beurteilt. Morphometrische Analysen der Schichtdicken der inneren und äußeren Körnerzellschicht konnten helfen, einen potenziell neurodegenerativen Effekt der *Ceacam1*-Deletion zu evaluieren. Außerdem erfolgte die Bestimmung von Expressionslevel angiogener und proinflammatorischer Faktoren und Mitglieder des TGF- $\beta$ -Signalwegs mittels quantitativer RT-PCR.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzienliste

Tab. 1: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
10X Reaktions-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Amoniumchlorid	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Arur	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Borax	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cacodylatpuffer	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA
Chlorophorm	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
DDSA (Dodecenyl-bernsteinsäureanhydrid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DEPC-Wasser	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DePeX	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DMP-30 (2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
EDTA	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glutaraldehyde	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Glycidether	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MNA (1-Methylnicotinamide chlorid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Moviol	Universität Würzburg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland

NGS (normal goat serum)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Osmiumferrocyanid	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Propylenoxid	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA
SDS 0,2%	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, Dublin, Irland
Tris-HCL	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Triton	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizol®	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Xylol	Universität Würzburg

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-well-Platten	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Deckgläschen (Menzel-Gläser)	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
flache Einbettungs-Gießformen	Plano, Wetzlar, Deutschland
Glaswaren	Duran®, Wertheim, Deutschland
Grid-Box	Plano, Wetzlar, Deutschland
Latex-Untersuchungshandschuhe power grip	unizell Medicare, Bad Schwartau, Deutschland
Nickelnetzchen	Plano, Wetzlar, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand®, Wertheim, Deutschland
Rasierklingen	Plano, Wetzlar, Deutschland
Reaktionsgefäße „EasyFit“ mit Deckel	Paul Böttger, Bodenmais, Deutschland
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

Tab. 3: Liste der verwendeten Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Combi-Spin FVL 2400N	Biosan, Riga, Lettland
Diatome	Science Service, München, Deutschland
Digitalmikroskop Keyence VHX6000	Keyence, Osaka, Japan
Einbettkarusell TP1020	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Elektronenmikroskop LEO 912 AB	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoresszenzmikroskop Keyence BZ9000	Keyence, Osaka, Japan
Gießstation M2080/K	BAVIMED, Birkenau, Deutschland
Konfokalmikroskop Eclipse TI-E	NIKON, Tokio, Japan
Ofen	Memmert, Schwabach, Deutschland
pH-Meter FE20/EL20	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetten Discovery comfort	HTL LAB solutions, Warschau, Polen
Schlittenmikrotom SM2010 R	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Schüttler KL2	Edmund Bühler, Bodelshausen, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000c	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems™, Foster City, Kalifornien, USA
Thermomix ME Wasserbad	B. Braun Biotech, Berlin, Deutschland
Ultracut-Schneidegerät E	Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland
Wasserbad 1052	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5418, 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.3 Puffer

Tab. 4: Liste der verwendeten Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Digestionspuffer	2 ml 5 M NaCl 1 ml 10% SDS 0,5 ml 0,5 M EDTA 5 ml 1M Tris-HCL (pH 8,0) 41,5 ml Ampuva H <sub>2</sub> O
EM-Fixans, ph 7,4	2,5 ml Paraformaldehyd 2,5 ml Glutaraldehyd 95 ml 0,1 M Cacodylatpuffer
Epon-Stammlösung	26 g Glycidether 11 g DDSA 15 g MNA 0,25 g DMP-30
4% Paraformaldehyde-Lösung (PFA)	4% Paraformaldehyd 0,1 M PBS, pH 7,4
Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,4	4,9 g Kaliumdihydrogenphosphat 23,3 g Natriumdihydrogenphosphat in 2 l Aqua dest.
PBST/BSA-Puffer	1% BSA in PBS 0,3% Triton
Citrat-Puffer, pH 6,0	18 ml 0,1 M Zitronensäure 82 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat 900 ml Aqua dest.
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,1 M, pH 7,4	137 mM Natriumchlorid 2,68 mM Kaliumchlorid 9,58 mM di-Natriumhydrogenphosphat 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14 g Tris in Aqua dest. lösen pH einstellen auf 1 l

## 2.1.4 Enzyme und Kits

Tab. 5: Liste der verwendeten Enzyme und Kits

Enzym/Kit	Hersteller
DNase I, RNase-frei	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - 10X RT Buffer - 10X RT Random Primers - 25X dNTP Mix (100 mM) - MultiScribe™ Reverse Transcriptase - Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Applied Biosystems™, Foster City, Kalifornien, USA
M.O.M.® Kit - M.O.M.® Blocking Reagent - M.O.M.® Diluent	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
M.O.M.® Biotinylates Anti.Mouse IgG Reagent	
REDTaq®ReadyMix™	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Takyon™ ROX SYBR® MasterMix dTTP blue	Eurogentec, Lüttich, Belgien

## 2.1.5 Verwendete Antikörper

Tab. 6: Liste der verwendeten Antikörper

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärantikörper
CEACAM1	mcc1, mouse, 1:100, eigene Herstellung	M.O.M.® Kit	Neutravidin DyLight 550, 1:400 Invitrogen
Kollagen IV	Anti-mouse- Collagen IV, 1:40, Bio Rad 2150- 1470	Goat-anti-rabbit Cy5, 1:500, Invitrogen	
IBA1 (Paraffin)	Anti-Iba1, rabbit, 1:1000, Wako, 019-19741	Goat-anti-rabbit biotin, 1:500, Invitrogen	Streptavidin Alexa 555, 1:500, Invitrogen
IBA1 (Flachpräparat)	Anti-Iba1, rabbit, 1:500, Wako, 019-	Goat-anti-rabbit Cy3, 1:500,	

	19741	Invitrogen
Rhodopsin	Anti-Rhodopsin, bovine, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc- 57432 AF488, 1:50	Streptavidin Alexa 488, direkt gekoppelt mit Primärantikörper

### 2.1.6 Oligonukleotid-Primer für PCR

Tab. 7: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen für PCR

Primer	Sequenz	Hersteller
Cc1_fwd	5'-GGA ACTCCTGCTGCAGTTGAC-3'	Invitrogen
Cc1_ex2_rev	5'-GTGACTTCAGCAGTGGTGGC-3'	Invitrogen
Cc1_neo	5'-GCAGTTCATTCAGGGCACCG-3'	Invitrogen

Die Wildtypform von *Ceacam1* befindet sich auf der Laufhöhe von 1175 bp (Basenpaare), die der transgenen Tiere befindet sich bei 560 bp.

### 2.1.7 Oligonukleotid-Primer für RT-qPCR

Tab. 8: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen für RT-qPCR

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>Ccl2</i>	5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3' 5'-GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT-3'	Invitrogen
<i>GAPDH</i> (Housekeeper)	5'-TGTCCGTCGTGGATCTGAC-3' 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	Invitrogen
<i>Gnb2l</i> (Housekeeper)	5'-TCTGCAAGTACACGGTCCAG-3' 5'-ACGATGATAGGGTTGCTGC-3'	Invitrogen
<i>Iba1</i>	5'-GGATTTGCAGGGAGGAAAAG-3' 5'-TTCGATTGGGACCAACTGGAT-3'	Invitrogen
<i>Rpl32</i> (Housekeeper)	5'-GCTGCCATCTGTTTTACGG-3' 5'-GACTGGTGCCTGATGAACT-3'	Invitrogen
<i>Tgfβ1</i>	5'-CCTTCCTGCTCCTCATGG-3' 5'-CGCACACAGCAGTTCTTCTC-3'	Invitrogen

<i>Tgfβ2</i>	5'-AGGAGGTTTATAAAAATCGACATGC-3' 5'-TAGAAAGTGGGCGGGATG-3'	Invitrogen
<i>Tgfβ3</i>	5'-CCCTGGACACCAATTACTGC-3' 5'-TCAATATAAAGGGGGCGTACA-3	Invitrogen
<i>Tgfβ1</i>	5'-AGAAGAGCGTTCATGGTTCC-3' 5'-CGTCCATGTCCCATTGTCT-3'	Invitrogen
<i>Tgfβ2</i>	5'-AGAAGCCGCATGAAGTCTG-3' 5'-CCTCCTGCTCCTCATGG-3'	Invitrogen
<i>Tnf-α</i>	5'-TCTTCTCATTCTGCTTGTGG -3' 5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'	Invitrogen

### 2.1.8 Versuchstiere

Im Rahmen der Experimente erfolgten lediglich Organentnahmen, somit war ein Tierversuchsantrag nicht notwendig. Außerdem wurde kein menschliches Material verwendet, daher konnte auf einen Ethikantrag verzichtet werden.

#### 2.1.8.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden im Tierstall ZEMM der Universität Würzburg unter Standardbedingungen gehalten. Die Luftfeuchtigkeit betrug  $55\% \pm 5\%$ , die Temperatur betrug  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Den Tieren stand stets Futter und Wasser zur Verfügung. Es wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus simuliert.

#### 2.1.8.2 Tierlinien

Zur Untersuchung der physiologischen Expression von CEACAM1 sowie als Kontrollgruppe in Experimenten mit genetisch veränderten Mäusen, wurden wildtypische Tiere des C57BL/6J -Mausstammes verwendet.

Die Folgen eines *Ceacam1*-Knockouts wurden anhand von *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen (genetischer Hintergrund: C57BL/6J) untersucht. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Süleyman Ergün zur Verfügung gestellt. Die genetische Veränderung wurde durch Deletion der ersten beiden Exons von *Ceacam1* generiert [81].

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewebeaufbereitung für die Histologie

Nach tierschutzgerechter Tötung der Mäuse wurden die Lider gespreizt und die Augen vorsichtig mittels einer Pinzette hinter dem Bulbus durch leichten Zug herauspräpariert.

Die enukleierten Augen wurden für 4-6 Stunden (h) in 4% Paraformaldehyde in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4) fixiert und anschließend in 0,1 M PBS gespült, siehe hier Tab. 9. Bei Bedarf konnten sie nach Schritt 4 über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Tab. 9: Spülschritte der enukleierten Augen im Vorfeld der Paraffineinbettung

Schritt	Reagenz	Dauer
1., 2., 3., 4.,	0,1 M PBS (pH 7,4)	je 15 Minuten (min)
5.	50% Isopropanol	1 h
6.	70% Isopropanol	1 h
7.	70% Isopropanol	1 h

Die Paraffineinbettung der Augen erfolgte mit dem Einbettkarussell TP1020 (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) am darauffolgenden Tag wie in Tab. 10 angegeben.

Tab. 10: Schritte der Paraffineinbettung

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

Anschließend fand die Ausbettung der Präparate mit der Gießstation M2080/K (BAVIMED, Birkenau, Deutschland) statt.

Die Herstellung der Paraffinschnitte wurden mittels eines Schlittenmikrotoms SM2010 R (Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) durchgeführt, wobei 6 µm dünne Schnitte in mittig-sagittaler Ebene, mit geöffneter Pupille und auf Höhe der Papille, angefertigt wurden. Die mit einem Pinsel aufgenommenen Schnitte wurden auf einen mit 70%igem

Ethanol befeuchteten Objektträger überführt und im Anschluss in einem Wasserbad (1052 von GFL, Burgwedel, Deutschland) bei 45°C gestreckt, um im weiteren Verlauf auf einen SuperFrost Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen zu werden und über Nacht bei 37°C (Ofen, Memmert, Schwabach, Deutschland) zu trocknen.

### 2.2.2 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz wird das gewünschte Antigen durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert, welcher bei einer bestimmten Wellenlänge des Lichtes im Fluoreszenzmikroskop angeregt werden kann. Dabei wird ein Primärantikörper-Antigen-Komplex gebildet, der durch einen den Fluoreszenzfarbstoff tragenden Zweitantikörper markiert wird [82]. Bevor die Antikörper die Zielantigene markieren können, müssen die in Paraffin eingebetteten, histologischen Schnitte, wie im Folgenden beschrieben, entparaffiniert und demaskiert werden.

#### Entparaffinierung

Die in Paraffin eingebetteten und mit 4% Paraformaldehyde in 0,1 M PBS fixierten Schnitte mussten zunächst einer Entparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe (Tab. 11) unterzogen werden, bevor sie für 5 min in destilliertem Wasser rehydriert wurden.

Tab. 11: Entparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe

Schritt	Reagenz	Dauer
1.	Xylol	10 min
2.	Xylol	10 min
3.	Ethanol 100%	5 min
4.	Ethanol 100%	5 min
5.	Ethanol 96 %	5 min
6.	Ethanol 80%	5 min
7.	Ethanol 70%	5 min
8.	Aqua destillata	5 min

#### Demaskierung

Die entparaffinierten Schnitte wurden anschließend einer Demaskierung unterzogen, wobei ein saurer Citrat-Puffer (pH 6,0) verwendet wurde. Hierzu wurde Puffer in einer

Küvette zunächst in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt, die Schnitte im Anschluss eingetaucht und der Puffer für weitere 10 Sekunden (sec) in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Darauf folgte eine 50-sec-Abkühlphase in der Küvette bei Raumtemperatur, bevor der Puffer wieder für 10 sec zum Kochen erhitzt wurde. Diese Schritte wurden 7-mal wiederholt und anschließend die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Puffer wurde innerhalb von 5 min durch langsam zugegebenes destilliertes Wasser (Aqua dest.) ersetzt und die Schnitte daraufhin in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 0,1 M, pH 7,4) überführt.

### 2.2.2.1 Immunhistochemische Färbungen

#### CEACAM1-Färbung mittels M.O.M.<sup>®</sup>-Kit

Zur Färbung von CEACAM1 wurden verschiedene Vorversuche mit diversen primären Antikörpern und immunhistochemischen Methoden durchgeführt. Schließlich wurde eine Kombination aus einem spezifischen mCC1-Antikörper und Mouse on Mouse<sup>®</sup> (M.O.M.<sup>®</sup>)-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) verwendet. Die einzelnen Schritte wurden, wie in Tab. 12 dargestellt, durchgeführt.

Tab. 12: CEACAM1-Färbung mittels mCC1-Antikörper und M.O.M. <sup>®</sup>-Kit

Schritt	Reagenz	Dauer
1. Blockierung	M.O.M. <sup>®</sup> Blocking Reagent, 1 Tropfen M.O.M. <sup>®</sup> Blocking Reagent pro 1,25 ml PBS	1 h, RT
2. M.O.M. <sup>®</sup> Diluent	M.O.M. <sup>®</sup> Diluent, 120µl pro 1,5 ml PBS	5 min, RT
3. Primär-AK-Inkubation	mCC1-AK, 1:100 in M.O.M. <sup>®</sup> Diluent	30 min, RT
4. Waschen	PBS	2x 2 min, RT
5. Sekundär-AK-Inkubation	M.O.M. <sup>®</sup> Biotinylates Anti-Mouse IgG Reagent, alternativ: Goat-anti-mouse-Biotin, 10µl pro 2,5ml M.O.M. <sup>®</sup> Diluent	10 min, RT
6. Waschen	PBS	2x 2 min, RT
7. Tertiär-AK-Inkubation	Neutravidin DyLight 550, 1:400 in PBS	30 min, RT
8. Waschen	PBS	2x 2min, RT
9. Dapi-Färbung	Dapi, 1:5000 in PBS	30 min, RT
10. Waschen	PBS, anschließend kurz in Aqua dest.	2x 2 min, RT

	eintauchen
11. Eindecken	Moviol

### **Doppelfärbung von CEACAM1 und Kollagen IV**

Um die genaue Lokalisation des CEACAM1-Signals zu verifizieren, wurde eine Doppelfärbung mit Kollagen IV durchgeführt. Kollagen IV ist unter anderem auch ein Bestandteil der Basalmembran, die jedes Gefäß umgibt [3] und zeigt somit die Position der Gefäße innerhalb der Retina gut an.

Entparaffinierung und Demaskierung liefen, wie oben beschrieben, ab. Im Folgenden wurden die Schnitte mit dem Primär-Antikörper für Kollagen IV (Anti-mouse-Kollagen IV, Bio Rad 2150-1470) in einer Verdünnung 1:40 in 1% Normal Goat Serum (NGS) in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte für je 5 min in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Sekundär-Antikörper (Goat-anti-rabbit Cy5) in einer Verdünnung 1:500 in 1% NGS in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3-mal für je 5 min in PBS gewaschen. Bevor die Färbung von CEACAM1 folgte, wurde durch Auflegen eines Deckglases die Qualität der Kollagen IV-Färbung fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Bei ausreichender Qualität wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und die CEACAM1-Färbung mittels mCC1 als primärem Antikörper und M.O.M.<sup>®</sup>-Kit, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ9000 (Keyence, Osaka, Japan), welches mit der Software BZ-II Analyser (Version 1.42) ausgestattet war.

### **Färbung von IBA1 im retinalen Flachpräparat**

Die Färbung von IBA1 im retinalen Flachpräparat erfolgte unmittelbar nach der Präparation des Auges, welches für 90 min in 4 % PFA bei Raumtemperatur anfixiert wurde. Daraufhin schlossen sich 2 Spülschritte in PBS für jeweils 10 min an. Anschließend wurde die Retina unter mikroskopischer Sicht herauspräpariert und in eine 48-Well-Platte mit Blockpuffer überführt. Es folgte die Blockierung mit PBST/BSA über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Daraufhin wurde die Inkubation mit dem Primär-Antikörper (anti-Iba1, rabbit, Wako) in PBST/BSA in einer Verdünnung 1:500 für 48 h bei 4°C durchgeführt. Nach erneutem Waschen in PBST/BSA in PBS im Verhältnis 1:2 für 5-mal 20 min wurden die Retinae mit dem Sekundär-Antikörper (Goat-anti-rabbit Cy3, Invitrogen) in einer Verdünnung 1:500 in PBST/BSA zusammen mit Dapi (1:1000)

für 24 h bei 4°C inkubiert. Es erfolgten wiederholt 4 Waschschriffe je 20 min mit PBST/BSA in PBS im Verhältnis 1:2 sowie einmaliges Waschen in PBS für 20 min. Abschließend wurden die Retinae flach auf dem Objektträger ausgebreitet und von 4 Seiten leicht eingeschnitten, um abschließend mit Moviol eingedeckt zu werden. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Diese Färbungen wurden durch Alla Ganscher angefertigt.

Die Mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem inversen Konfokalmikroskop Eclipse TI-E (Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt, welches mit der NIS-Elements Advanced Research Software (Nikon, Tokio, Japan) ausgestattet ist.

### **Doppelfärbung von IBA1 und Rhodopsin**

Zur genaueren Darstellung der IBA1 positiven Zellen im subneuroretinalen Raum wurden Doppelfärbungen von Paraffinschnitten angefertigt. Hierzu erfolgte, wie oben beschrieben, zunächst die Entparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe (vergleiche (vgl.) Tab. 11) sowie die Demaskierung mit Citrat-Puffer (pH 6,0). Daraufhin wurden die Präparate für 30 min in 0,05 mM Ammoniumchlorid bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min in 0,5% Triton in PBS überführt. Es folgten drei Spülschritte in PBS für je 5 min, bevor die Schnitte für 60 min in 5% NGS in PBS blockiert wurden. Anschließend wurde die Inkubation mit den Primär-Antikörpern anti-Iba1 (rabbit, Wako) in 5% NGS in PBS in einer Verdünnung 1:1000 sowie anti-Rhodopsin gekoppelt mit Alexa Fluor 488 (mouse, Santa Cruz Biotechnology) in 1% NGS in PBS in einer Verdünnung 1:50 über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach erneutem Waschen in PBS für dreimal 5 min wurden die Objektträger mit dem Sekundär-Antikörper für anti-Iba1 (Goat-anti-rabbit biotin, Invitrogen) in einer Verdünnung 1:500 in 1% NGS in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten wiederholt 3 Waschschriffe von je 5 min mit PBS im Dunkeln mit anschließender Inkubation in Streptavidin Alexa 555 in PBS in einer Verdünnung von 1:500 versetzt mit Dapi. Abschließend wurden die Objektträger dreimal für 5 min in PBS im Dunkeln gewaschen und mit Moviol eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

### **2.2.3 Licht- und Elektronenmikroskopie**

Zur Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten wurden die entnommenen Augen in EM-Fixans (2,5% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer; pH 7,4) überführt. Um eine bessere Fixierung der Augen zu erreichen, wurde nach circa einer Stunde die Cornea vorsichtig gefenstert und die Augen über Nacht bei 4°C im

Fixans belassen. Es folgten 4 Spülschritte für je 30 min in 0,1 M Cacodylatpuffer (ph 7,4) sowie eine Nachfixierung in 1% Osmiumferrocyanid in 0,1 M Cacodylatpuffer für eine Stunde. Im Anschluss wurden die Augen dreimal 15 min in Aqua dest. gespült und daraufhin mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert (vgl. Tab. 13).

Tab. 13: Entwässerung des Gewebes bei der Einbettung in Epon

Schritt	Reagenz	Dauer
1.	30% Ethanol	15 min
2.	50% Ethanol	15 min
3.	70% Ethanol	15 min
4.	2% UA in 70% Ethanol	60 min
5.	70% Ethanol	15 min
6.	80% Ethanol	15 min
7.	90% Ethanol	15 min
8.	96% Ethanol	15 min
9. / 10.	100% Ethanol	15 min

Es folgte die Einbettung in Epon, wobei zunächst zwei Spülschritte mit Propylenoxid für je 30 min vorgeschaltet und anschließend die Augen über Nacht in einer 1:1 Lösung aus Epon und Propylenoxid inkubiert wurden, bevor sie für 2 h in reines Epon übergingen. Nachfolgend wurden die Augen in flache Einbettungs-Gießformen (Plano, Wetzlar, Deutschland) gelegt, diese mit frischem Epon ausgegossen und bei 60°C für 48 h auspolymerisiert.

### 2.2.3.1 Anfertigung von Semidünnschnitten

Die Semidünnschnitte wurden mittels Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung, Nußloch Deutschland) 1 µm dünn geschnitten, auf einen Objektträger mit Aqua dest. überführt und bei 80°C auf einer warmen Platte getrocknet, um Falten im Präparat vorzubeugen. Als nächstes wurde für 15-30 sec Methylenblau (Ansatz: 1 g Methylenblau, 1 g Borax, 1 g Arur je 100 ml Aqua dest.) auf die Schnitte gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Die Eindeckung erfolgte mit Depex. Die Schnitte wurden von S. Schenk und K. Reinfurt-Gehm angefertigt.

### 2.2.3.2 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Für die Ultradünnschnitte wurden die eingebetteten Augen im Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) mit einem Diamantmesser (DiATOME) 60-80 nm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend auf mit 0,7 % Formvar in

Chloroform beschichtete Nickelnetzchen überführt. Die Schnitte wurden von S. Schenk und K. Reinfurt-Gehm angefertigt.

#### **2.2.4 Morphometrische Analyse**

Grundlage der morphometrischen Auswertungen waren Übersichtsaufnahmen von Semidünnschnitten, die mit dem Digitalmikroskop Keyence VHX6000 (Keyence, Osaka, Japan) aufgenommen wurden.

Zur Ausmessung der neuronalen Schichtdicken der Retina wurde das Programm Fiji genutzt. Zunächst wurden beide Hemisphären der Retina Computer-assistiert ausgemessen und 9 gleichmäßig verteilte Messpunkte je Hemisphäre generiert. Hierzu wurde das Macro „Segment Selection“ ([https://github.com/skoschad/ij/blob/master/Segment\\_Selection.ijm](https://github.com/skoschad/ij/blob/master/Segment_Selection.ijm)) verwendet. An den 18 Messpunkten wurde die Dicke der INL sowie ONL gemessen. Die Werte wurden anschließend in Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, Washington, USA) überführt und statistisch ausgewertet.

#### **2.2.5 Genotypisierung der Versuchstiere**

Zur molekularbiologischen Kontrolle der Genotypen der verwendeten Versuchstiere mittels PCR wurden Proben der Mausschwänze einer Lyse unterzogen. Hierzu wurde die Biopsie mit 500 µl Digestions-Puffer zusammen mit 10 µl Proteinase K in einer Verdünnung von 1:50 versetzt und bei 55°C im Wasserbad über Nacht inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war.

Im Anschluss wurden den Proben 500 µl Isopropanol zugegeben und diese bei -20°C für 10 min inkubiert, um daraufhin bei 4°C für 5 min und 13000 rounds per minute (rpm) zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgezogen, dem verbliebenen Gemisch wurden 500 µl 70%-iges Ethanol beigefügt und dieses erneut für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation (13000 rpm) bei 4°C für 5 min, der Überstand wurde erneut abgezogen. Das zurückbleibende Pellet im Reaktionsgefäß wurde wiederholt für 30 Sekunden bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und das nun verbliebene Ethanol vorsichtig abpipettiert.

Zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion wurden 1 µl der gewonnen DNA zum PCR-Mastermix gegeben, dessen Zusammensetzung in Tab. 14 aufgelistet wird.

Tab. 14: Mastermix PCR

Reagenz	Volumen
MgCl <sub>2</sub>	0,3 µl
Primer 1 10 µM	0,3 µl
Primer 2 10 µM	0,3 µl
Primer 3 10 µM	0,3 µl
RedTaq-Mix	7,5 µl
H <sub>2</sub> O	5,3 µl

Abhängig vom Genotyp der Versuchstiere wurden entsprechende Primer (Tab. 7) verwendet. Das Gemisch aus DNA und Mastermix wurde gut gevortext und abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems™, Foster City, Kalifornien, USA) gemäß dem in Tab. 15 aufgeführten Programm.

Tab. 15: Programm PCR – Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95 °C	2 min	1x
2	95 °C	30 sec	
3	60 °C	30 sec	40x
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	5 min	1x

Bei jeder durchgeführten PCR erfolgte eine Negativ- (= H<sub>2</sub>O) - und eine Positiv- (= DNA eines positiven Tiers) Kontrolle, um sicherzustellen, dass es sich bei den dargestellten Banden um spezifische Signale handelt.

### 2.2.6 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Bei der RT-qPCR handelt es sich um die kombinierte Methode einer reversen Transkription (RT) mit darauffolgender quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR). Bei der initialen reversen Transkription wird die Ribonukleinsäure (RNA) isoliert durch eine reverse Transkriptase in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Die anschließende Amplifikation der cDNA in der PCR ermöglicht es, aus einer kleinen Ausgangsmenge RNA eine ausreichend große Menge cDNA zu erzeugen, die zur quantitativen Analyse (qPCR) notwendig ist. Zur Vermehrung spezifischer cDNA werden dem Ansatz spezifische Primer zugesetzt. Somit bietet

diese molekularbiologische Methode die Möglichkeit, auf die quantitative Expression spezifischer RNA sowie die Transkriptionsaktivität über die Bestimmung der mRNA-Expression Rückschlüsse zu ziehen [83-85].

Zunächst wurde die mRNA aus den Proben von Retina und Choroidea isoliert. Hierzu erfolgte die Inkubation derselben nach Zerkleinerung mit einem Mörser mit 600 µl TRIzol® Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) für 5 min bei Raumtemperatur. Das entstandene Lysat wurde in Reaktionsgefäße überführt und 120 µl Chlorophorm hinzugegeben. Nach einer Ruhepause von 3 min bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin befindliche RNA durch Zugabe von 300 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Im Anschluss erfolgte die erneute Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgezogen und verworfen. Das zurückbleibende Pellet wurde nun durch Zugabe von 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen und wiederholt für 10 min bei 7500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das überstehende Ethanol wurde wieder abgezogen und der Vorgang wiederholt. Das entstandene Pellet wurde anschließend 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, um im Weiteren mit 25 µl RNase-freiem-Depc-Wasser für 10 min bei 60°C gelöst zu werden. Die Lagerung der Proben erfolgte daraufhin bei -80°C.

Im nächsten Schritt wurden die gewonnenen mRNA-Proben auf ihre Qualität und Reinheit photometrisch mit dem Spektralphotometer NanoDrop™ (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) untersucht. Hierbei zeigte das Verhältnis der Absorption bei 260nm für DNA und 280nm für Proteine die Reinheit der Proben. Um im weiteren Verlauf der Versuche berücksichtigt zu werden, wurde ein Quotient A260/280 von  $\geq 1,8$  als Qualitätskriterium festgelegt.

Die Umwandlung der gewonnenen mRNA in eine cDNA erfolgte mittels High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems™, Foster City, Kalifornien, USA). Zuvor wurden die Proben von möglichen DNA-Bestandteilen gesäubert. Hierzu wurde die mRNA-Probe, wie folgt (Tab. 16), mit DNase I (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA) in Reaktion gebracht:

Tab. 16: Zusammensetzung der Reagenzien zur Säuberung der mRNA-Proben

Reagenz	Volumen
RNA	1 µg
10X Reaktions-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	1 µl
DNase I, RNase-frei	1 µl
DEPC-Wasser	bis 10 µl

Das Gemisch wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 1 µl 50 mM EDTA versetzt und bei 65°C für 10 min erneut inkubiert. Zur Vorbereitung der cDNA-Synthese wurde der 2X RT Master Mix angesetzt. Die einzelnen Komponenten wurden langsam auf Eis aufgetaut und, wie folgt (Tab. 17), pipettiert:

Tab. 17:  
Zusammensetzung  
des 2X RT Master Mix

Reagenz	Volumen
10X RT Puffer	2,0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primer	2,0 µl
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl
Nuclease-freies Wasser	4,2 µl
gesamt	10,0 µl

Anschließend wurden 10 µl des 2X RT Master Mix' zusammen mit 10 µl der mRNA-Proben (1 µg RNA in 10 µl) in eine 96-well-Platte gegeben, vorsichtig vermischt und zentrifugiert. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gelagert. Zur Durchführung der Reversen Transkription wurde folgendes Programm (Tab. 18) am Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems™, Foster City, Kalifornien, USA) hinterlegt:

Tab. 18: Programm der Reversen Transkription

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
<b>Temperatur</b> (°C)	25	37	85	4
<b>Zeit (min)</b>	10	120	5	∞

Das Reaktionsvolumen wurde auf 20 µl definiert und die Reverse Transkriptase Reaktion gestartet. Die Lagerung der cDNA-Proben fand kurzfristig bei 2°C bis 6°C und langfristig bei -15°C bis -25°C statt.

Zur Durchführung der qPCR erfolgte zunächst die Verdünnung der 20 µl cDNA-Proben der RT-Reaktion im Verhältnis 1:10 mit 180 µl destilliertem Wasser. Der qPCR-Mix wurde, wie in Tab. 19 angegeben, zusammengesetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 12 µl des Ansatzes je Well pipettiert und mit 3 µl der cDNA-Verdünnung auf 15 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die qPCR erfolgte daraufhin mit einem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA). Das Gerät wurde so programmiert, dass 40 Zyklen durchlaufen wurden. Der Ablauf eines Zyklus ist in Tab. 20 aufgelistet. Um am Ende eine quantitative Beurteilung der Genexpression zu ermöglichen, wurde auch das Expressionslevel der Housekeeper-Gene *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)*, *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Gnb2l1)* und *Ribosomal Protein L32 (Rpl32)* bestimmt. Um die Expression der Zielgene zu bestimmen, wurde mittels  $\Delta\Delta$  ct Methode [86] deren Expressionsstärke auf die Expression des Mittelwert der 3 Housekeeper Gene normiert.

Tab. 19: Zusammensetzung des qPCR-Mix

Reagenz	Volumen
2x MasterMix (ROX SYBR® Takyon™, Eurogentec, Belgien)	7,5 µl
Primer forward	0,6 µl aus 1:10 Primer-Verdünnung
Primer reverse	0,6 µl aus 1:10 Primer-Verdünnung
Aqua destillata	3,3 µl
gesamt	12,0 µl

Tab. 20: Programm qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95°C	10 sec
2	95°C	10 sec
3	60°C	25 sec

---

4	95°C	10 sec
5	50°C	25 sec
6	95°C	10 sec

---

### **2.2.7 Statistik**

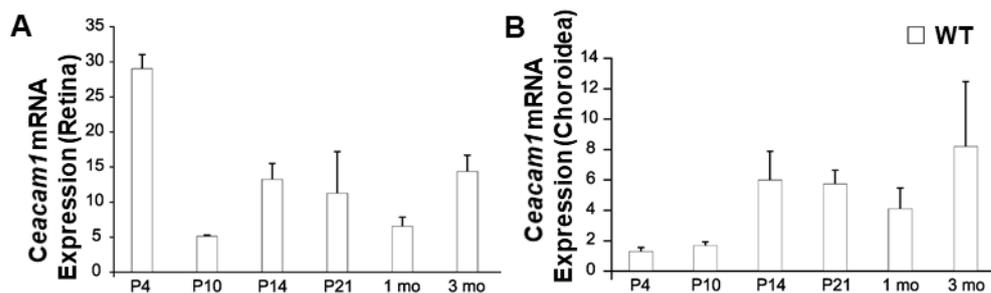
Die Auswertung gewonnener numerischer Daten sowie deren graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, Washington, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  standard error of the mean (SEM) dargestellt. Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels dem „Students´s“ T-Test berechnet. Als signifikanten Unterschied wurde ein  $p < 0,05$  angenommen und mit \* markiert, ein hochsignifikanter Unterschied mit  $p < 0,01$  und mit \*\* gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Physiologische *Ceacam1*-Expression im Auge

Zunächst wurde die Expression von *Ceacam1* in der Retina und Choroidea im zeitlichen Verlauf untersucht. Dazu wurde die mRNA Expression von *Ceacam1* bei Bl.6 Wildtyp-Mäusen mittels RT-PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Hierbei konnte in der Retina sowohl für die frühen postnatalen Tage P4, P10, P14, P21, als auch für die adulten Tiere im Alter von 1 und 3 Monaten, *Ceacam1*-mRNA nachgewiesen werden. Auffallend war, dass die höchste *Ceacam1*-Expression in der Retina an P4 detektiert wurde und die Expression danach abnahm (vgl. Abb. 6).

Auch in der Choroidea war die Expression von *Ceacam1*-mRNA an P4, P10, P14, P21, sowie bei 1 und 3 Monate alten Mäusen zu jedem Zeitpunkt nachweisbar (Abb. 6B). Vergleichend betrachtet, war die Menge der quantitativ bestimmten mRNA in der Choroidea jedoch niedriger als in der Retina (Abb. 6A und B).

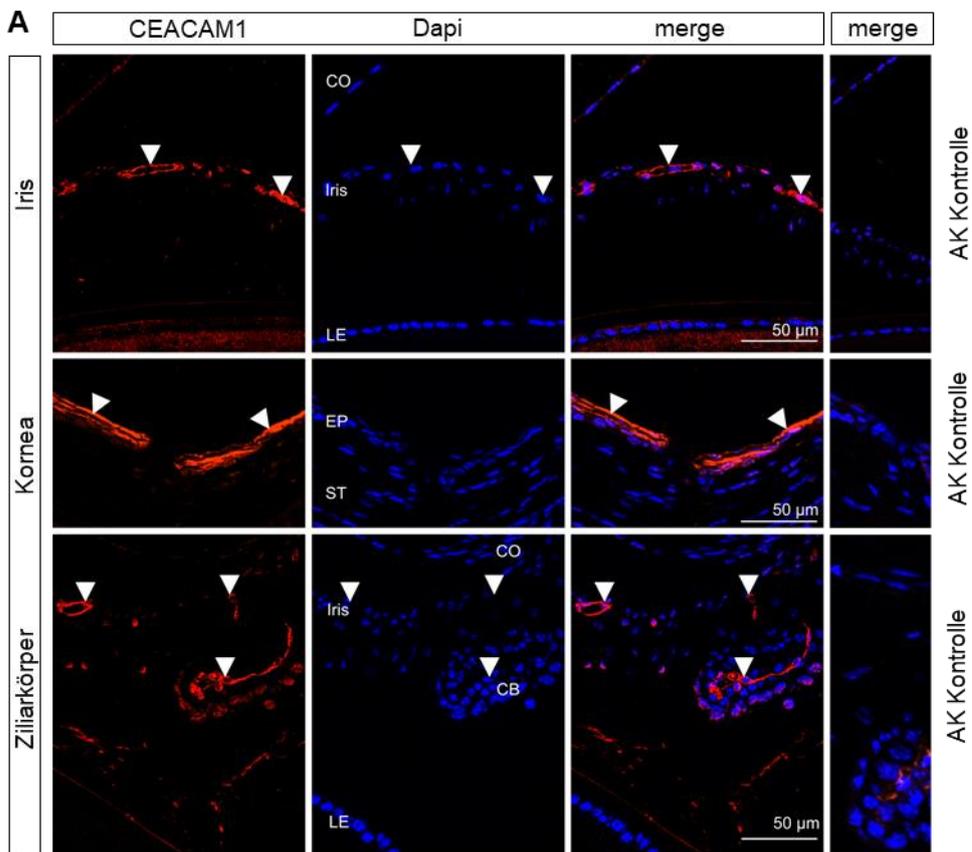


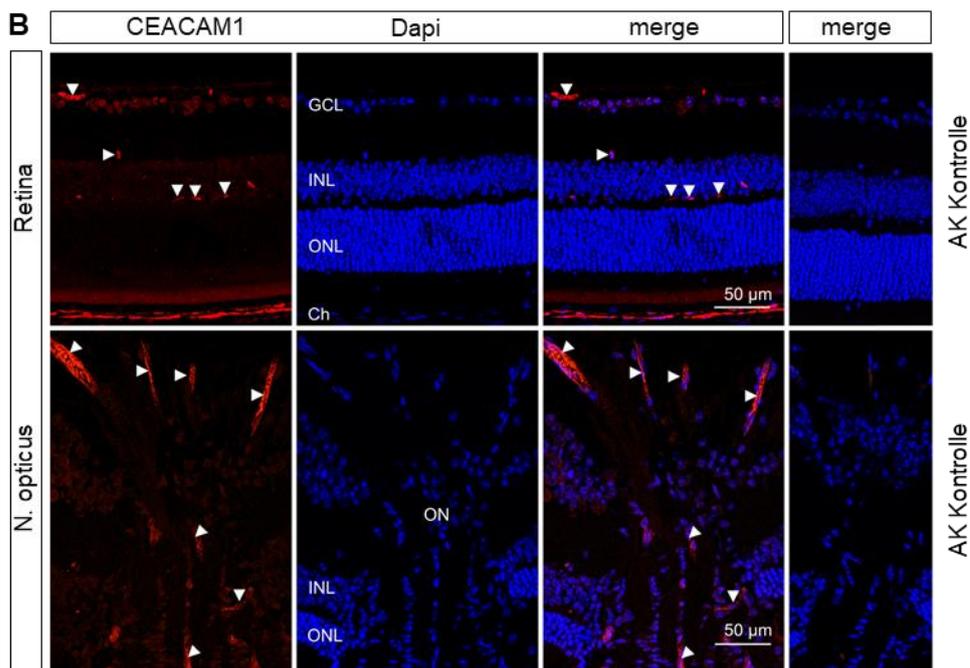
**Abb. 6: *Ceacam1* mRNA-Expression in retinalem und choroidalem Gewebe.**

Relative mRNA-Expressionslevel von *Ceacam1* in retinalem (A) und choroidalem (B) Gewebe von P4, P10, P14, P21, 1 Monat und 3 Monate alten wildtypischen Mäusen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n \leq 3$  pro Zeitpunkt.

Um zu untersuchen, in welchen Zellpopulationen oder Regionen des Auges CEACAM1 exprimiert wird, wurden mittels spezifischem mCC1-Antikörper immunhistochemische Färbungen an 30 Tage alten Bl.6 Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde die Expression von CEACAM1 im ganzen Auge detailliert untersucht. So zeigte sich im vorderen Augenabschnitt (Abb. 7A) in der Iris ein deutliches CEACAM1-Signal (Abb. 7A, oben) das seinem Erscheinungsbild nach den dort verlaufenden Gefäßen glich. Des Weiteren war eine intensive CEACAM1-Expression im Bereich des Korneaepithels detektierbar (Abb. 7A, Mitte). Ebenso konnten Signale im Bereich des Ziliarkörpers nachgewiesen werden. Hier zeigte sich zum einen die Expression im Bereich der Gefäßkonvolute des Ziliarkörpers lokalisiert, zum anderen war ein dezentes Signal im

nicht-pigmentierten Epithel desselben zu erkennen (Abb. 7A, unten). Neben dem vorderen Augenabschnitt wurde auch der hintere Augenabschnitt bezüglich eines CEACAM1-Signals in der immunhistochemischen Färbung begutachtet (Abb. 7B). In der Retina zeigte das CEACAM1-Signal die typische Dreischichtung, entsprechend der drei retinalen Gefäßplexus [15], im Bereich der Ganglienzellschicht (GCL) sowie der inneren und äußeren plexiformen Schicht (IPL, OPL) (Abb. 7B, oben). Zudem war eine CEACAM1-Expression in den Gefäßen des N. opticus (Abb. 7B, unten) und in denen der Choroidea detektierbar (Abb. 7A, oben). Die Antikörper-Kontrollen zeigten keine positiven Signale, was auf eine spezifische CEACAM1 Färbung hinweist. Lediglich im Ziliarkörper ließ sich ein dezentes Signal erkennen, das am ehesten als Autofluoreszenz von Erythrozyten zu interpretieren ist (Abb. 7A, unten rechts).

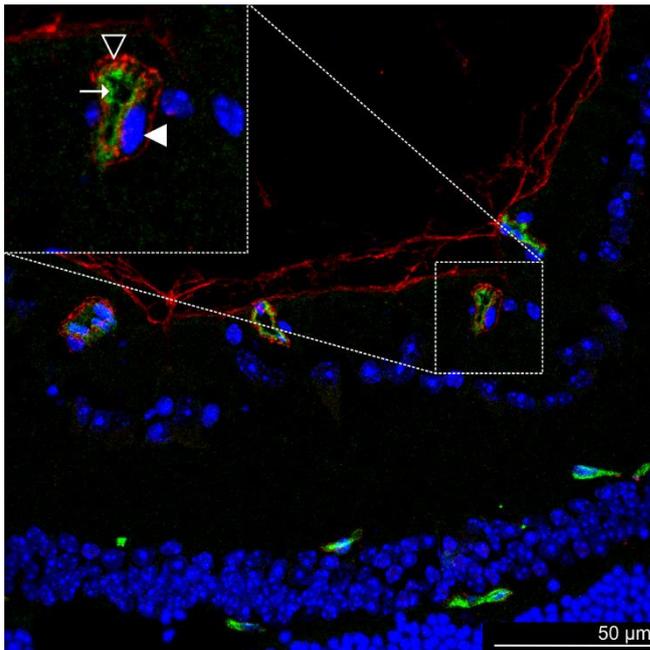




**Abb. 7: CEACAM1-Expression im vorderen (A) und hinteren (B) Augenabschnitt.**

Immunohistochemische Färbungen 30 Tage alter Bl.6-Wildtyp Mäuseaugen mittels spezifischem mCC1-Antikörper zeigen die Expression von CEACAM1 (rot, weiße Pfeilköpfe) im Bereich des vorderen Augenabschnitts (A) in den Gefäßen der Iris und des Ziliarkörpers sowie deutlich im Epithel der Kornea. Zudem lässt sich eine diskrete Aktivität im nicht-pigmentierten Epithel des Ziliarkörpers nachweisen. Im hinteren Augenabschnitt (B) ist ein Signal von CEACAM1 (rot, weiße Pfeilköpfe) in den Gefäßen der Retina, der Choroidea sowie des N. opticus zu erkennen. Zellkerne sind Dapi gefärbt (blau). Die Antikörperkontrollen (AK Kontrolle) zeigen keine CEACAM1-positiven Strukturen. CO = Kornea, LE = Linse, CB = Ziliarkörper, EP = Epithel, ST = Stroma, GCL = Ganglienzellschicht, INL = Innere Körnerzellschicht, ONL = Äußere Körnerzellschicht, ON = Nervus opticus.

Zur genaueren Zuordnung der CEACAM1-Expression im Bereich der Gefäße wurde eine Doppelfärbung von CEACAM1 mit Kollagen IV bei 30 Tage alten Bl.6 Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die detektierte Kollagen IV-Expression zeigt die Lage von Gefäßen an, da es als Bestandteil der Lamina densa der Basalmembran die Gefäße umschließt [3]. Innerhalb der Kollagen IV haltigen Basallamina ließ sich in der Doppelfärbung mit mCC1-Antikörpern das rote CEACAM1-Signal erkennen, sodass die Zuordnung zum Endothel und damit den Gefäßen klar festzustellen ist (vgl. Abb. 8). In der Vergrößerung links oben im Bild ist außerdem zu erkennen, dass Perizyten, welche mit den Endothelzellen in der Basallamina liegen (Abb. 8, weißer Pfeilkopf) CEACAM1-negativ sind.



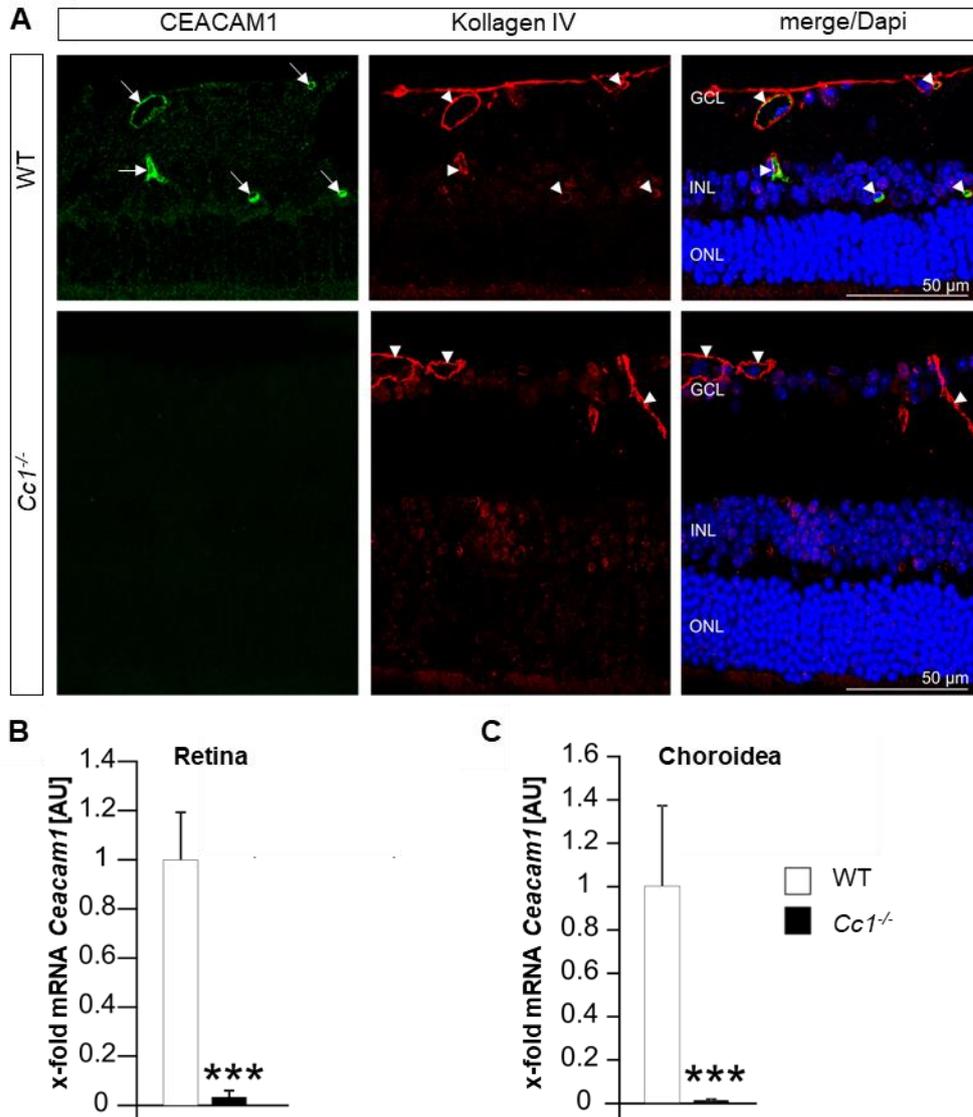
**Abb. 8: Lokalisation der CEACAM1-Expression in der Retina.**

Immunhistochemische Färbung eines retinalen Schnitts einer 3 Monate alten B6.I-Wildtyp-Maus. Zur Darstellung der gefäßumgebenden Basalmembran wurde diese mit Kollagen IV (rot, schwarzer Pfeilkopf) angefärbt. Die Expression von CEACAM1 (grün, Pfeil) wurde mittels mCC1-Antikörpern dargestellt. Der weiße Pfeilkopf in der links oben liegenden Vergrößerung zeigt auf einen Perizyten, der von der Kollagen IV-positiven Basallamina umhüllt, aber CEACAM1 negativ ist. Zellkerne sind Dapi gefärbt (blau).

### 3.2 Knockout-Nachweis von *Ceacam1* bei *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Um mögliche Funktionen von CEACAM1 im Auge näher zu studieren, wurde die Morphologie der Augen von *Ceacam1*-defizienten Mäusen (*Cc1<sup>-/-</sup>*) detailliert untersucht. Zunächst wurde jedoch der Nachweis eines erfolgreichen Knockouts von *Ceacam1* in den Versuchstieren vorangestellt. Hierzu erfolgte eine immunhistochemische Doppelfärbung von CEACAM1 und Kollagen IV an den Augen von wildtypischen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Sowohl in den wildtypischen als auch in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen sind die Gefäße von einer Basalmembran umgeben, welche unter anderem Kollagen IV enthält [3]. Somit konnte die Lokalisation der Gefäße genau dargestellt werden. In den Wildtypen zeigte sich das CEACAM1-Signal in direkter Assoziation mit diesen Gefäßen, hingegen war in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen neben dem Kollagen IV-Signal kein CEACAM1 Signal zu detektieren, was auf eine erfolgreiche Deletion von *Ceacam1* in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen hinweist, sowie auf eine spezifische Reaktion des verwendeten Antikörpers (Abb. 9A). Zur genaueren Evaluation eines erfolgreichen Knockouts von *Ceacam1* wurde im Anschluss die quantitative Analyse der mRNA-Expression von *Ceacam1* in Wildtypen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen mittels RT-PCR

angeschlossen (Abb. 9 B und C). Hierbei zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der mRNA-Expression von *Ceacam1* in den Knockout-Tieren gegenüber den wildtypischen Kontrollen. Die erfolgreiche Deletion von *Ceacam1* bei den verwendeten Versuchstieren wurde somit bestätigt.



**Abb. 9: Knockout von CEACAM1.**

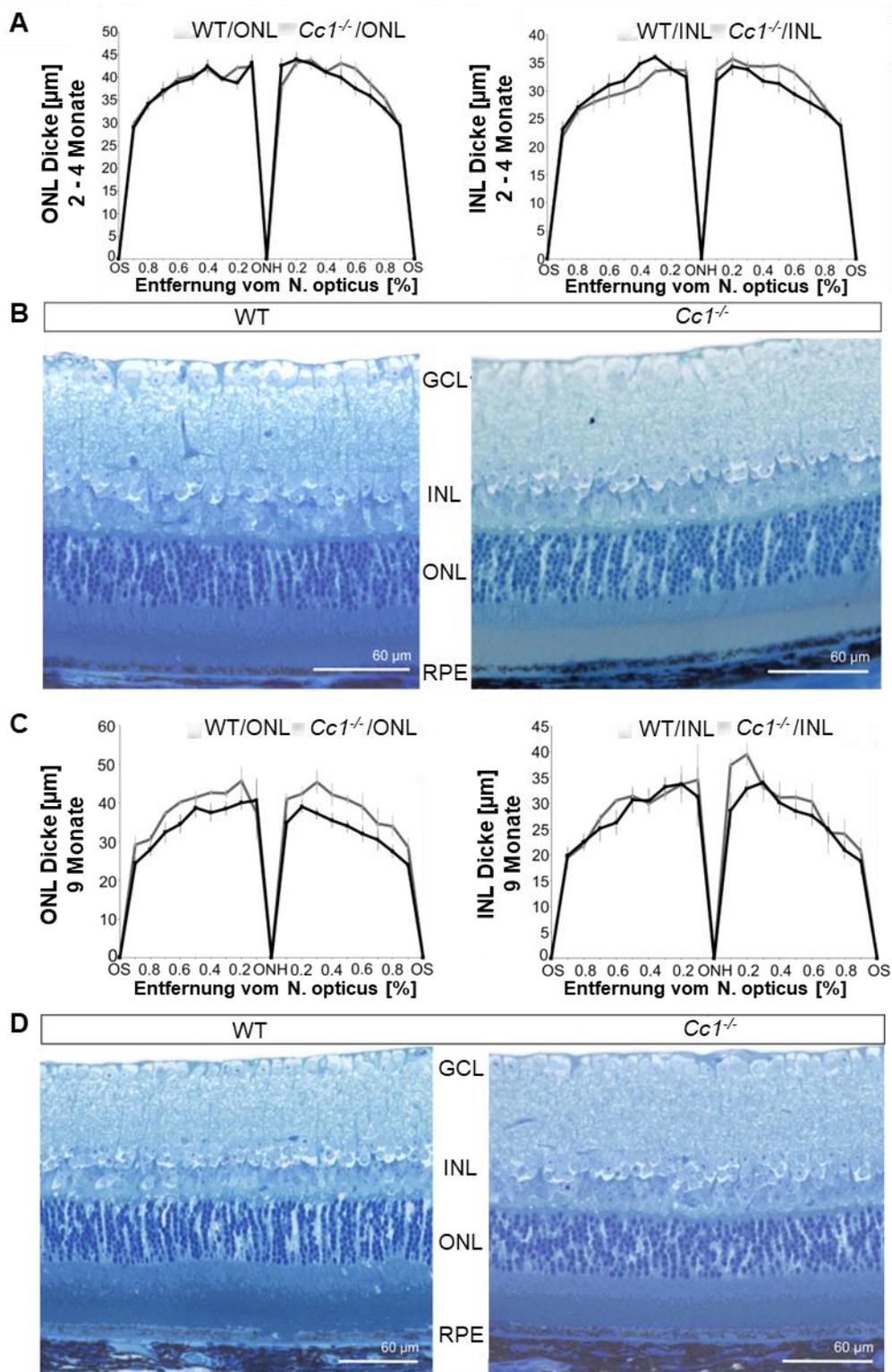
A: Doppelfärbung von CEACAM1 (grün, Pfeil) und Kollagen-IV (rot, Pfeilkopf) von 3 Monate alten wildtypischen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Retinae. Zellkerne sind mit Dapi gefärbt (blau). GCL = Ganglienzellschicht, INL/ONL = Innere/Äußere Körnerzellschicht. B und C: Retinale (B) and choroideale (C) mRNA-Expression von *Ceacam1* in 2 - 4 Monate alten wildtypischen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Es zeigt sich eine erfolgreiche Deletion von *Ceacam1*. Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n \leq 6$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , Student's t-test. AU= arbitrary unit.

### 3.3 Morphologische und Morphometrische Analysen von *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Im weiteren Verlauf konzentrierte ich mich auf die detaillierte Analyse des hinteren Augenabschnittes mit dem Ziel zu untersuchen, ob eine Deletion von *Ceacam1* zu morphologischen Veränderungen führen würde. In der lichtmikroskopischen Vergrößerung von Semidünnschnitten 2 - 4 und 9 Monate alter *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse ließen sich keine Unterschiede der retinalen Schichten im Vergleich zu den wildtypischen Bl.6 Mäusen feststellen (Abb. 10 B und D).

Zur Beurteilung einer möglichen diskreten Neurodegeneration der retinalen Neurone infolge des Knockouts von *Ceacam1* erfolgte die morphometrische Beurteilung der Schichtdicke des INL und ONL. Diese werden von den hier lokalisierten Perikarya der 1. und 2. Neurone der Sehbahn gebildet [2]. Im Rahmen einer neuronalen Degeneration wäre hier eine Reduktion der Neurone und damit gleichzeitig der Schichtdicke zu erwarten. Die durchgeführte Ausmessung der Dicke von INL und ONL bei wildtypischen und transgenen Tieren an definierten Messpunkten im Verlauf der Retina wird in sogenannten Spiderdiagrammen in Abb. 10 A und C dargestellt. Im Alter von 2 - 4 Monaten zeigten sich nach anschließender statistischer Auswertung der Mittelwerte der Meßpunkte keine signifikanten Unterschiede in der Schichtstärke zwischen Wildtypen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen (Abb. 10A). Des Weiteren wurden gleiche Untersuchungen bei retinalen Schnitten 9 Monate alter Versuchstiere durchgeführt. Hierbei ergab sich ebenso kein signifikanter Unterschied, jedoch war tendenziell zu erkennen, dass es in der ONL zu einer dezenten Abnahme der Schichtdicke in *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse gegenüber den Wildtypen kam (Abb. 10C).

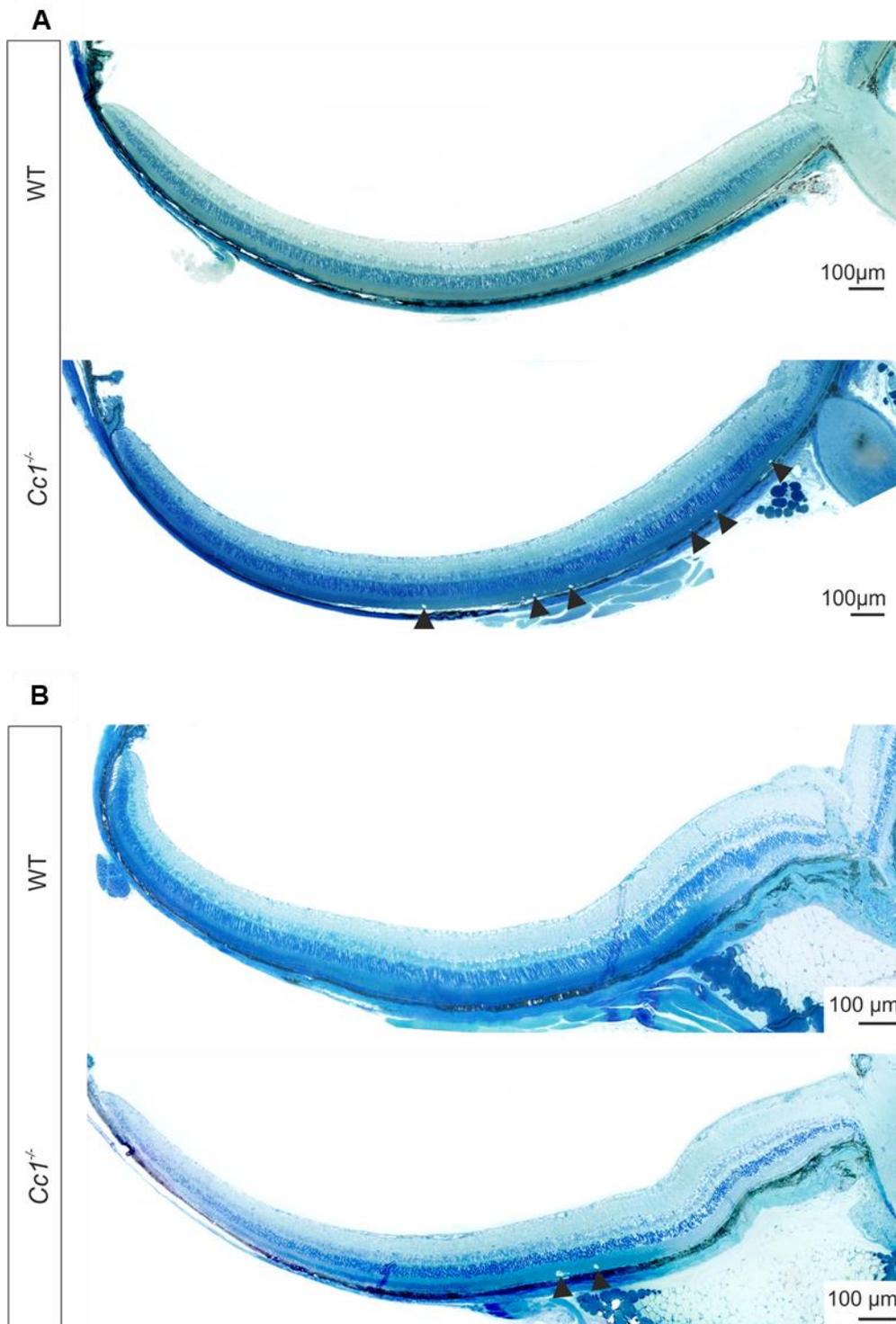
In der Betrachtung der retinalen Hemisphären im Überblick konnten vereinzelte kleine zystische Formationen (Abb. 11, schwarze Pfeilspitzen) im subneuroretinalen Raum bei den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Tieren beobachtet werden, hierunter ist der Bereich zwischen den Photorezeptor-Außensegmenten und dem RPE zu verstehen.



**Abb. 10: Morphometrische und Morphologische Analysen der retinalen Schichtung von WT und  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen im Alter von 2 - 4 Monaten (A und B) und 9 Monaten (C und D).**

Spider-Diagramme der ONL und INL Dicke von 2 - 4 (A) und 9 (C) Monate alten  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen zeigen keinen signifikanten Unterschied. In der detaillierten Vergrößerung der zentralen Retina (B und D) von

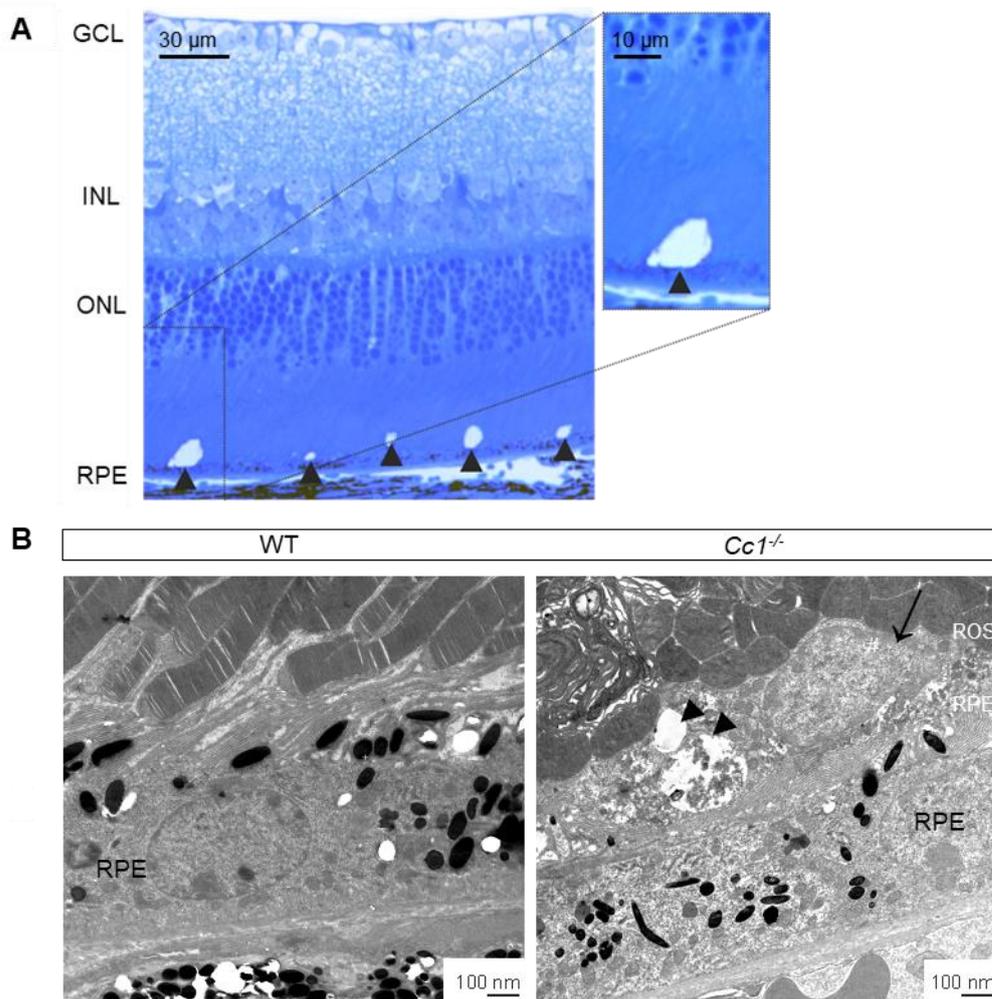
Wildtypen und  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen ist eine reguläre Schichtung der retinalen Neurone zu erkennen. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Wildtypen  $n = 8$ ,  $Cc1^{-/-}$   $n = 6$ ,  $p > 0.05$ , Student's t-test.



**Abb. 11: Retinale Hemisphären im Überblick von 2 - 4 (A) und 9 (B) Monate alten Wildtypen und  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen.**

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Semidünnschnitten retinaler Hemisphären zeigen in den  $Cc1^{-/-}$ -Tieren kleine Zysten (Pfeilköpfe) nahe des RPEs. WT = Wildtyp

In der lichtmikroskopischen Vergrößerung zeigten sich im Randbereich dieser zystischen Auffälligkeiten teilweise auch Zellkerne (vgl. Abb. 12A und B). In der weiteren Untersuchung dieser phänotypischen Veränderungen mittels des Elektronenmikroskops konnten phagozytisch aktive Zellen mit Zysten, die mit phagozytiertem Material gefüllt waren, beschrieben werden (vgl. Abb. 12B). Im Rahmen dieser detaillierten Betrachtung ließen sich keine Auffälligkeiten im Aufbau des RPEs feststellen. Ebenso war das fenestrierte Endothel der Gefäße der Choriokapillaris ohne Veränderungen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. Morphologisch zeigte sich der Bereich der äußeren Blut-Retina-Schranke bei den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen ohne phänotypische Unterschiede gegenüber den Kontrollen.



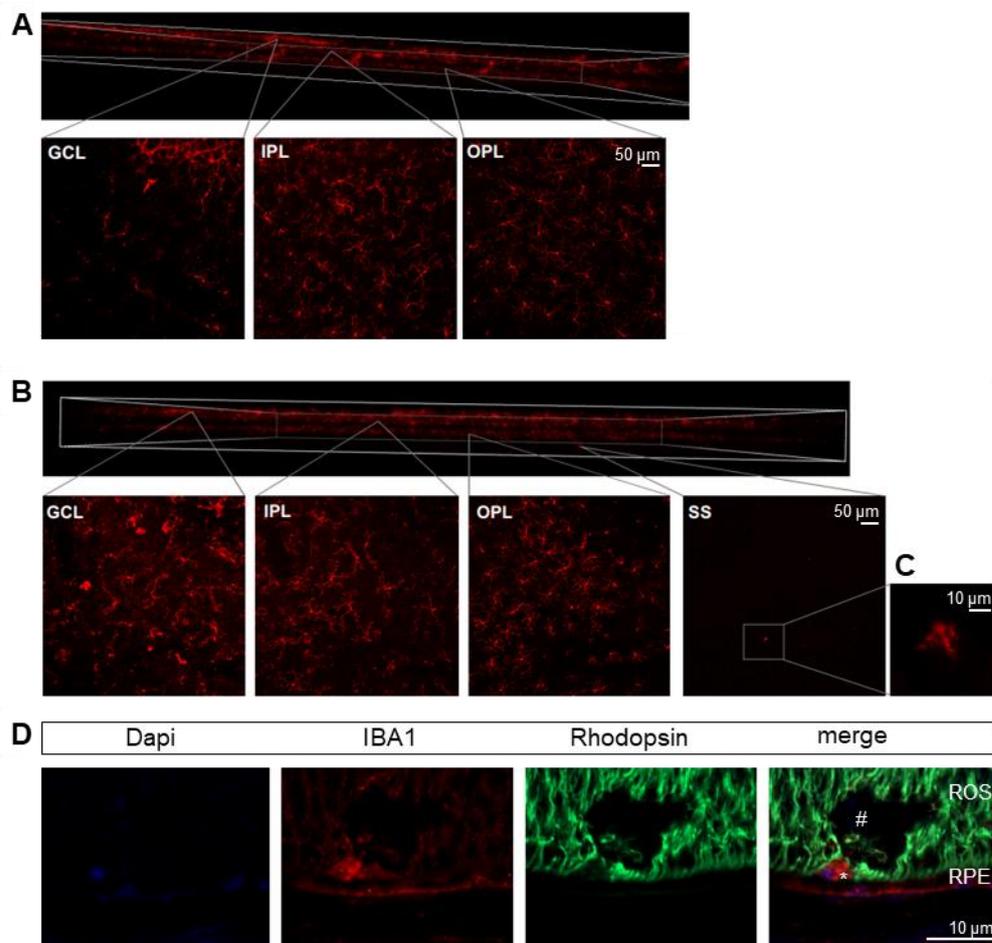
**Abb. 12: Detaillierte Aufnahmen der kleinen Zysten im subneuroretinalen Raum (A) und deren Ultrastruktur (B) bei 2 - 4 Monate alten B6.I-Wildtypen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen.**

In der lichtmikroskopischen Detailaufnahme (A) retinaler Semidünnschnitte sind kleine Zysten (schwarzer Pfeilkopf) im Bereich zwischen Photorezeptor-Außensegmenten und RPE zu erkennen. Die Ultrastruktur in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (B) dieser Veränderung zeigt einen Zellkörper (Pfeil) einer phagozytisch aktiven Zelle mit Zysten, welche mit phagozytiertem Material (schwarze Pfeilköpfe) gefüllt

sind. GCL = Ganglienzellschicht, INL/ONL = Innere/Äußere Körnerzellschicht, RPE = Retinales Pigmentepithel.

### **3.4 IBA1 positive Zellen in der Retina von $Cc1^{-/-}$ -Mäusen**

Phagozytische aktive Zellen in der Retina können zum einen eingewanderte Makrophagen zum anderen Mikroglia sein [3]. Beide Zellpopulationen können mittels immunhistochemischer Färbungen von ionisiertem Calcium bindenden Adapter Molekül 1 (IBA1) dargestellt werden [87]. Zur genaueren Differenzierung der detektierten phagozytisch aktiven Zellen im subneuroretinalen Raum in den Retinaschnitten von  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen wurden immunhistochemische Färbungen am retinalen Flachpräparat von 3 Monate sowie 9 Monate alten  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen und wildtypischen Mäusen durchgeführt. Die Aufnahmen zeigen eine typische Dreischichtung von IBA1 positiven Zellen in der Retina von Wildtyp sowie  $Cc1^{-/-}$ -Mäusen im Bereich der retinalen Ganglienzellen, sowie der IPL und OPL. Zudem war in der dreidimensionalen Darstellung der retinalen Flachpräparate zu erkennen, dass bei  $Cc1^{-/-}$ -Tieren unterhalb der drei physiologisch vorkommenden Positionen ruhender Mikrogliazellen vereinzelt in einer vierten Schicht IBA1 positive Zellen vorkamen. Diese Ebene entspricht von der Position her dem subneuroretinalen Raum (Abb. 13A und B). Bei detaillierter Betrachtung der IBA1 positiven Zellen ließ sich im Vergleich von wildtypischen und transgenen Mäusen erkennen, dass sie sich in ihrer Morphologie unterscheiden. So zeigten sich die IBA1 positiven Zellen in den Wildtypen ramifiziert und filigran, hingegen war die Morphologie der IBA1 positiven Zellen im subneuroretinalen Raum der  $Cc1^{-/-}$ -Mäuse, plump und amöboid, was auf einen reaktiven Zustand dieser Zellen hinweist (Abb. 13C). Immunhistochemische Doppelfärbungen mit IBA1 und Rhodopsin, das Bestandteil der Außensegmente der Photorezeptoren ist, zeigen zudem einen klaren Lagebezug IBA1 positiver Zellen zu den zystoiden Raumforderungen zwischen RPE und den Außensegmenten der Photorezeptoren (Abb. 13D).



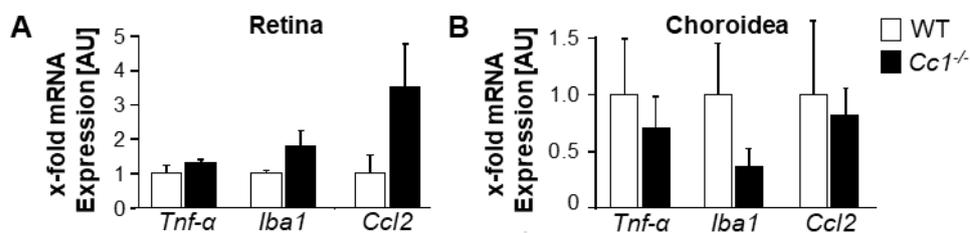
**Abb. 13: IBA1 positive Zellen in der Retina**

3D-Rekonstruktion von IBA1 (rot) gefärbten Retinaschnitten von 12 Wochen alten Kontrollen (A) und 9 Monate alten *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen (B). In den wildtypischen Kontrollen (A) sind drei Schichten ramifizierter IBA1-positiver Zellen zu erkennen, die in den dafür typischen Ebenen der Retina lokalisiert sind. In den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Retinaschnitten (B) sind zusätzlich zu den drei Schichten IBA1-positive Zellen in einer weiteren, mit dem subneuroretinalen Raum korrelierend, zu erkennen. Des Weiteren zeigen sich die IBA1-positiven Zellen in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen in der Mehrheit in einer amöboiden Morphologie (C), am ehesten einem reaktiven Zustand entsprechend. D: Die immunhistochemische Doppelfärbung mit IBA1 (rot) und Rhodopsin (grün) lässt eine IBA1 positive Zelle (\*) mit Dapi gefärbtem Zellkern (blau) und assoziierter zystoider Raumforderung (#) zwischen RPE und Photorezeptor-Außensegmenten erkennen (Färbung und Aufnahme von N. Kleefeldt). GCL = Ganglienzellschicht, IPL= Innere plexiforme Schicht, OPL = Äußere plexiforme Schicht, SS = Subneuroretinaler Raum, ROS = Photorezeptor-Außensegmente.

### 3.5 Expression immunmodulierender Faktoren in *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Um zu untersuchen, ob die Expression immunmodulierender Faktoren in der Retina und Choroidea von neun Monate alten Versuchstieren verändert sei, wurden quantitative Analysen mittels RT-PCR zur Bestimmung des mRNA-Levels von *ionisiertem Calcium bindenden Adapter Molekül 1 (Iba1)* sowie *Tumornekrosefaktor- $\alpha$*

(*Tnf-α*) und *CC-Chemokin-Ligand-2* (*Ccl2*) durchgeführt. *Ccl2* wird u.a. von Müllerzellen produziert [88] und führt als Chemokin zur Aktivierung und Rekrutierung von Mikroglia in entzündete und geschädigte Areale [89, 90]. Neben anderen Zellen produzieren und setzen aktivierte Mikroglia *Tnf-α* frei [91], ein bedeutender Faktor in der Initiierung inflammatorischer Reaktionen bis hin zu Nekrose und Apoptose [91, 92]. Im Rahmen der Untersuchungen konnten zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen festgestellt werden. Jedoch lässt sich eine Tendenz erkennen, die darauf hinweist, dass in den CEACAM1 defizienten Tieren vermehrt *Iba1* als auch *Ccl2* in der Retina exprimiert wurden, im Vergleich zu gleichaltrigen, wildtypischen Kontrolltieren. In den Proben der Choroidea zeigte sich hingegen, dass die Expressionslevel der drei untersuchten Parameter in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen unter denen der Wildtypen blieben (vgl. Abb. 14).



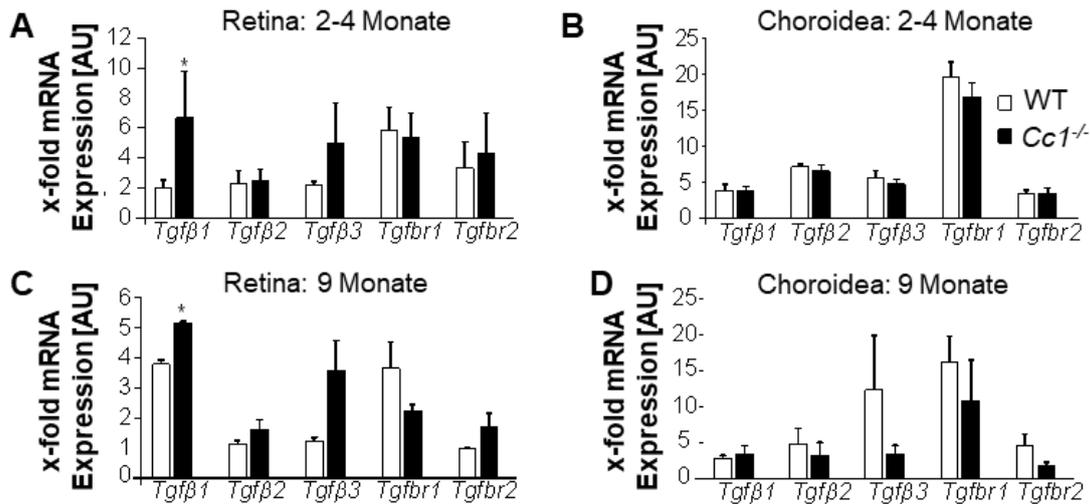
**Abb. 14: mRNA Expressionslevel von *Iba1* sowie immunmodulierenden Faktoren *Tnf-α* und *Ccl2* in Retina (A) und Choroidea (B).**

Die Ergebnisse der mRNA-Bestimmung mittels RT-PCR zeigen unterschiedliche Expressionslevel in der Retina (A) bei neun Monate alten *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und ihren wildtypischen Geschwistern. So lässt sich eine tendenzielle Mehrexpression von *Iba1*, *Tnf-α* und *Ccl2* in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Retinae erkennen. Hingegen sind in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Choroidea keine höheren Expressionslevel dieser Faktoren als in denen der Kontrollen zu messen. Daten sind Mittelwerte ± SEM. Retina: Wildtypen (9 Monate) n = 3; *Cc1<sup>-/-</sup>* (9 Monate) n = 4. Choroidea: Wildtypen (9 Monate) n = 2; *Cc1<sup>-/-</sup>* (9 Monate) n ≤ 3. AU= arbitrary unit.

### 3.6 Expression von Vertretern des TGF-β-Signalweges in *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Da die bisherigen Untersuchungen Hinweise auf ein vermehrtes immunologisches Geschehen in den Gewebeproben von Retinae der *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen lieferten und der TGF-β -Signalweg an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Augen beteiligt ist [93], sowie Interaktionen zwischen CEACAM1 und dem TGF-β-Signalweg beschrieben sind [94, 95], wurde im Folgenden die Expression von Mitgliedern des TGF-β-Signalweges in *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen untersucht. Die durchgeführten quantitativen Analysen der Retina mittels RT-PCR zeigten signifikant erhöhte mRNA-Level von *Tgfb1* in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Tieren gegenüber den wildtypischen

Kontrollen bei sowohl 2 - 4 als auch 9 Monate alten Versuchstieren. Zudem ließ sich eine tendenziell erhöhte Expression von *Tgfb3* in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen gegenüber den gleichaltrigen Kontrollen feststellen, wenngleich dies auch nicht signifikant war (vgl. Abb. 15A und C). Die Bestimmungen der mRNA Expression der Faktoren des TGF- $\beta$ -Signalwegs in den Proben der Choroidea derselben Tiere ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen (vgl. Abb. 15 B und D).



**Abb. 15: mRNA Expressionslevel von Liganden und Rezeptoren des TGF- $\beta$ -Signalweges.**

Retinale (A, C) and choroideale (B, D) mRNA-Expressionslevel in 2 - 4 (A, B) and 9 (C, D) Monate alten wildtypischen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Es lässt sich eine signifikant erhöhte Mehrexpression von *Tgfb1* in den 2 - 4 als auch 9 Monate alten *Cc1<sup>-/-</sup>* retinalen Proben gegenüber den Kontrollen messen. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Retina: Wildtypen: (2-4 Monate)  $n \leq 6$ , (9 Monate)  $n \leq 2$ , *Cc1<sup>-/-</sup>*: (2-4 Monate)  $n \leq 2$ , (9 Monate)  $n \leq 2$ . Choroidea: Wildtypen (2-4 Monate)  $n \leq 6$ , (9 Monate)  $n = 2$ ; *Cc1<sup>-/-</sup>* (2-4 Monate)  $n = 6$ , (9 Monate)  $n = 3$ . \*  $p \leq 0.05$ , Student's t-test. AU= arbitrary unit.

## 4 Diskussion

### 4.1 *Ceacam1*-Expression in Retina und Choroidea während der Entwicklung und im erwachsenen Tier

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) ist ein Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie, der bei der Erkennung von Pathogenen, der Immunmodulation, dem Wachstum von Tumoren und deren Metastasierung einen wichtigen Beitrag leistet [23, 96]. Außerdem konnte die Bedeutung von CEACAM1 im Rahmen von Vaskulo- und Angiogenese bereits in vielen Arbeiten bestätigt werden [40, 97, 98]. Seine Beiträge zur Proliferation von Endothelzellen und die Beeinflussung dieser hin zur dreidimensionalen Struktur, wie zum Beispiel bei der Ausbildung von Gefäßen, wurden von Ergün et al. 2000 [40] beschrieben. In diesem Zusammenhang konnte für CEACAM1 eine bedeutende Rolle in der Regulation von VEGF im Kontext der frühen Gefäßentwicklung gezeigt werden [33, 40]. Passend zu der angiogenetischen Wirkung von CEACAM1 konnten in der vorliegenden Arbeit in frühen postnatalen Entwicklungszeitpunkten in der Retina stark erhöhte *Ceacam1*-Expressionslevel detektiert werden, die im zeitlichen Verlauf zwar abnahmen, aber sowohl in der Retina als auch in der Choroidea stets detektierbar blieben. Verglichen mit der Choroidea waren die Expressionslevel in der Retina gerade zu den frühen postnatalen Untersuchungszeitpunkten (P4 – P21) relativ gesehen höher, was durch die erhöhte angiogenetische Aktivität in der Retina in den ersten drei postnatalen Wochen zu erklären ist, da alle drei die Retina durchziehenden Gefäßplexus in diesem Zeitraum ausgebildet werden [15, 99]. Die im zeitlichen Verlauf dieser untersuchten postnatalen Tage abnehmende *Ceacam1*-Expression ist vermutlich mit der reduzierten Expression von *Ceacam1* in den zunehmend ausgebildeten, adulten Gefäßen der Retina zu erklären. Wie Kilic et al. 2005 [33] bereits zeigten, ist die *Ceacam1*-Expressionshöhe stark von dem Entwicklungsstadium der Gefäße abhängig. So weisen unreife, sich im Wachstum befindliche Gefäße höhere Expressionsspiegel auf, als adulte, reife Gefäße [33]. In der Choroidea ist die Höhe der *Ceacam1*-mRNA Expression im Vergleich zur Retina in den ersten 21 postnatalen Tagen niedriger. Dies ist mit der bereits pränatal begonnenen Angiogenese der murinen Choroidea zu erklären [100]. Spannend ist, dass die untersuchten Zeitpunkte von einem und drei Monaten in der Retina und Choroidea überraschend hohe *Ceacam1*-Expressionswerte zeigten. Hieraus lässt sich in beiden Geweben eine anhaltende angiogenetische Aktivität ableiten, welche wiederum auf fortwährende Umbauprozesse der bestehenden Gefäße rückschließen lässt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von CEACAM1 dienten dazu, den Ort beziehungsweise Zellpopulationen der CEACAM1-Expression genauer einzugrenzen und ergänzen die quantitativen Daten der *Ceacam1*-mRNA-Level in Retina und Choroidea. In den Färbungen konnten in den Gefäßen der Retina, der Iris, des Ziliarkörpers, der Papille (Nervus opticus), als auch in der Choroidea starke Fluoreszenz-Signale detektiert werden. Detaillierte Aufnahmen von Doppelfärbungen von CEACAM1 und Kollagen IV, einem Marker, welcher die Basallamina unter anderem der Gefäße färbt, bestätigen die bereits beschriebene endotheliale Expression [33] von CEACAM1 und seine auch in adulten retinalen und choroidalen Gefäßen anhaltende Expression.

Zudem ist eine epitheliale Expression von CEACAM1 beschrieben [18]. Tatsächlich ist im Epithel der Kornea eine besonders starke Expression von CEACAM1 nachweisbar und zusätzlich ein dezentes Signal im nicht-pigmentierten Epithel des Ziliarkörpers

#### **4.2 *Cc1*<sup>-/-</sup>-Mäuse: Morphologie der Retina und Choroidea**

Die Rolle von CEACAM1 in der Retina wurde bisher nur sehr wenig erforscht. In einer von Ludewig et al. 2014 [45] veröffentlichten Arbeit wurden wildtypische Retinae mit denen von *Cc1*<sup>-/-</sup>-Mäuse verglichen. Hierbei konnten keine Veränderungen in der physiologischen Ausbildung von Gefäßen erkannt werden [45]. Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde die Morphologie der Retina wildtypischer Mäuse mit der von *Cc1*<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen. Hierbei zeigten sich keine Veränderungen in der Schichtung und dem Aufbau der Netzhaut. Ebenso ergaben auch morphometrische Evaluationen der Schichtdicke von äußerer (ONL) und innerer Körnerzellschicht (INL) keine signifikanten Unterschiede, was den Rückschluss zulässt, dass über den untersuchten Zeitraum von bis zu 9 Monaten, die Deletion von CEACAM1 nicht zur Neurodegeneration führte. In der ONL liegen die Neurone der Photorezeptoren und in der INL die der Amakrin-, Horizontal- und Bipolarzellen, sowie die Zellkörper der Müllerzellen [3]. In den untersuchten Schnitten 9 Monate alter Versuchstiere ließ sich tendenziell eine Reduktion der Schichtdicke der ONL erkennen, welche aber nicht signifikant war und aufgrund der geringen Zahl der zur Analyse verfügbaren Retinae äußerst vorsichtig zu interpretieren ist. Da CEACAM1 in der Retina nicht neuronal, sondern in retinalen Endothelzellen und Mikrogliazellen [101] exprimiert wird, wäre eine mögliche Neurodegeneration in den *Cc1*<sup>-/-</sup>-Tieren auch nur als indirektes Resultat erklärbar entweder durch eine endotheliale Dysfunktion und daraus resultierender Minderperfusion oder durch überschießende Mikrogliaaktivität. Da sowohl in meiner

Arbeit ein morphologisch unauffälliger Aufbau beobachtet werden konnte als auch in der Arbeit von Ludewig et al. 2014 [45] keine Unterschiede in der Entwicklung der primären Gefäßplexus sowie der darauffolgenden Gefäßreifung zu erkennen war, und die Gefäßdichte zwischen wildtypischen und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse nicht variierte [45], ist ein solch indirekt-neurodegenerativer Effekt von CEACAM1 als sehr unwahrscheinlich zu betrachten.

#### **4.3 *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigen eine Akkumulation IBA1 positiver, phagozytisch aktiver Zellen in subneuroretinalen Raum**

Im weiteren Verlauf meiner Arbeit wurde der subneuroretinale Raum detaillierter betrachtet. Hierbei fielen kleine, zystoide Veränderungen auf, welche häufig mit Zellkernen assoziiert waren. Spezifische Färbungen mit IBA1 ließen daraufhin in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen zystoiden Veränderungen, für diesen Marker positive Zellen erkennen. Dies können zum Beispiel Mikroglia aber auch eingewanderte Makrophagen sein [102, 103]. Wie physiologisch zu erwarten waren in IBA1 gefärbten retinalen Flachpräparaten drei Schichten IBA1 positiver Zellen sowohl in den wildtypischen als auch *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zu erkennen. Diese drei Schichten entsprechen den Ebenen, in welchen auch die Gefäßplexus liegen, mit denen retinale Mikroglia assoziiert sind [94]. Bei den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Tieren waren jedoch zusätzlich vereinzelt IBA1 positive Zellen im subneuroretinalen Raum detektierbar – eine untypische Position dieser Zellen in der Retina und genau der Bereich, in dem die zystoiden Veränderungen zu beobachten waren. Bei detaillierter Betrachtung der Morphologie dieser IBA1 positiven Zellen präsentierten sich diese in der typischen Form reaktiver Mikroglia, sprich mit einem amöboiden Körper und plumpen Ausläufern. Somit sind diese, eigentlich in der Ganglienzellschicht sowie inneren und äußeren plexiformen Schicht vorkommenden Mikroglia entweder von den weiter innen liegenden regulär lokalisierten Mikroglia in den subneuroretinalen Raum ausgewandert oder es sind IBA1 positive myeloide Zellen/Makrophagen über die äußere Blut-Retinaschranke, die von den tight junctions des RPE gebildet wird, eingewandert. Zur Überwindung der äußeren Blut-Retinaschranke und der Bruch'schen Membran, einer extrazellulären Matrixschicht, die zwischen dem RPE und dem Endothel der Choriokapillaris liegt [3], müssten jedoch diese in ihrer Integrität gestört sein, was sich zumindest elektronenmikroskopisch nicht nachweisen ließ. Somit ist zu vermuten, dass die Zellen ihren Ursprung aus der Retina selbst nehmen und über die Membrana limitans externa in die äußeren retinalen Schichten vorgedrungen sind. Hierbei stellt sich natürlich die Frage, weswegen IBA1 positive Zellen bei den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen in diesen Bereich

einwandern. Dies zu klären wird Inhalt zukünftiger Arbeiten sein, genauso wie die weitere Evaluation des RPEs und der Bruch'schen Membran auf ihre Dichte. Ob es sich bei den beobachteten Zellen tatsächlich um Mikroglia oder eingewanderte phagozytische aktive myeloide Zellen (Makrophagen) handelt, sollte ebenso Bestandteil weiterführender Untersuchungen sein, da sich sowohl Mikroglia, als auch eingewanderte Makrophagen positiv mit IBA1 anfärben lassen [103].

Das Auftreten der zystoiden Veränderungen im subretinalen Raum ist unter anderem für die Mutation des *Crb1* (crumbs cell polarity complex component 1) Gens, die im Tiermodell als RD8 (= retina degeneration)-Mutation bezeichnet wird, beschrieben [104]. Diese Mutation führt zu einem frame shift, welcher zu einem verfrühten stop codon und letztlich in einem dysfunktionalen Protein resultiert [104, 105]. Beim Menschen sind Mutationen im *CRB1* Gen mit autosomal rezessiver Stäbchen-Zapfen Dystrophie aus dem Formenkreis der Retinitis pigmentosa und der Leber'schen kongenitalen Amaurose assoziiert [106-108]. In der Retina stellt CRB1 ein Teil des CRB/Crb-Komplexes dar, welcher an der äußeren Grenzmembran (outer limiting membrane (OLM)) lokalisiert ist und sich unmittelbar apikal der Zonula adhaerentes befindet, welche die Photorezeptoren mit den Müller Gliazellen verbindet [109]. Dem CRB/Crb-Komplex wird hierbei eine wichtige Funktion in der Regulation der Zellpolarität und in der Aufrechterhaltung der Stratifizierung der Retina zugesprochen [109-113]. Diese bei Mäusen als RD8 bezeichnete Mutation tritt jedoch nicht in dem in dieser Arbeit verwendeten Bl6/J, sondern im Bl6/N Mausstamm auf [104]. Dennoch sollte vorsichtshalber die *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mauskolonie auf eine potenzielle Kontamination mit der RD8-Mutation untersucht werden. Dies wird aktuell bereits von der Arbeitsgruppe durchgeführt.

In Ergänzung mit den morphologischen Analysen wurden molekulare Analysen auf die mRNA-Expressionslevel für *Ccl2* sowie *Tnf- $\alpha$*  durchgeführt. *Ccl2* ist ein Chemokin, welches in Bereichen von Zellschäden und Entzündungen Mikroglia anlockt [87, 88]. Es wird dabei von verschiedenen Zellen ausgeschüttet, hierzu zählen Neurone, Astrozyten aber auch Endothelzellen [89]. TNF- $\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und wird von Mikroglia selbst produziert und sekretiert [89]. Dies führt unter anderem zur Zerstörung von tight junctions im RPE [89]. Die Initiierung dieser entzündlichen Prozesse und die darauffolgende Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia führt zu Nekrosen und Apoptose [95]. Die bezüglich der Expression von *Iba1*, *Ccl2* sowie *Tnf- $\alpha$*  untersuchten Retinae in meiner Arbeit stammten von 9 Monate alten Versuchstieren,

obwohl wir zu diesem Zeitpunkt bereits regelmäßig zystoide Veränderungen sahen, waren die pro-inflammatorischen Zytokine in der RNA der Gesamtretina nicht signifikant erhöht. Denkbar wäre, dass die Ausprägung des Phänotyps dennoch zu gering ist, um zu veränderten Expressionslevel in der Gesamtretina zu führen. Zudem muss auch hier die geringe Anzahl an Versuchstieren, die für diese Analysen zur Verfügung standen, angemerkt werden, weswegen dieses Ergebnis vorsichtig interpretiert werden sollte.

Nachdem ein Crosstalk von CEACAM und TGF- $\beta$  via deren Rezeptoren beschrieben ist [66], wurde die retinale mRNA-Expression der Liganden *TGF- $\beta$  1-3* und der *TGF- $\beta$  Rezeptoren 1 und 2* analysiert. Hierbei war sowohl bei jüngeren (2-4 Monaten, als auch bei älteren 9 Monate alten Mäusen) die Expression von *TGF- $\beta$ 1* signifikant erhöht. Interessanterweise ist TGF- $\beta$ 1 der Ligand, der vor allem im Schadensfall hochreguliert wird [114, 115] und passend dazu zeigten Butovsky et al. 2014 [116], dass TGF- $\beta$ 1 ein wichtiger Faktor für die Differenzierung von Mikroglia ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine vermehrte Stimulation des TGF- $\beta$ -Signalweges zum Schutz vor programmiertem Zelltod führt [76]. Die erhöhte Expression von *TGF- $\beta$ 1* könnte daher auch als Schutzmechanismus der Retina auf das proinflammatorische Geschehen, im Sinne der aktivierten IBA1 positiven Zellen im subneuroretinalen Raum, interpretiert werden.

In der Zusammenschau aller Erkenntnisse dieser Arbeit lässt sich perspektivisch festhalten, dass diese eine Grundlage zur weiteren differenzierten Untersuchung von CEACAM1 in der Retina gelegt hat. Auf Basis dieser Daten, dass CEACAM1 postnatal in der Retina als auch Choroidea exprimiert wird und auch über dies hinaus in adulten Entwicklungsstadien weiterhin nachweisbar ist, lässt sich zur dynamischen Rolle CEACAM1s in der Gefäßentwicklung und -modulation in der Retina weiter forschen. Es sollte zudem die genauere Differenzierung der IBA1-positiven Zellen in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Tieren bezüglich deren Zelltyps als auch Herkunft erfolgen. Des Weiteren lassen die signifikant erhöhten Expressionswerte von TGF- $\beta$ 1, sowie die beobachtete vermehrte Aktivität IBA1 positiver Zellen im subneuroretinalen Raum in den *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen eine potentielle Schadenssituationen vermuten, die noch genauer charakterisiert werden sollte.

## 5 Zusammenfassung

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) ist ein multifunktionales Zell-Zell Adhäsionsprotein, das in eine Vielzahl an zellulären Prozessen involviert ist, wie zum Beispiel der Differenzierung von Geweben, der Tumorsuppression, Metastasierung, Angiogenese und Apoptose. Außerdem hat es modulierende Eigenschaften auf die angeborene und erworbene Immunantwort. In der vorliegenden Arbeit charakterisierte ich initial die Lokalisation und die CEACAM1-exprimierenden Zelltypen im Auge und bestimmte quantitativ die Expression von *Ceacam1* in der Retina und Choroidea zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Es zeigte sich hierbei, dass *Ceacam1* zu allen untersuchten Zeitpunkten, sowohl während der Entwicklung als auch im adulten retinalen und choroidalen Gewebe nachweisbar war. Mittels Immunhistochemie konnte die Expression von CEACAM1 im Corneaepithel, den Gefäßen der Iris und des Ziliarkörpers, im nicht-pigmentierten Epithel des Ziliarkörpers, sowie in den retinalen und choroidalen Gefäßen nachgewiesen werden. Durch Doppelfärbung mit Kollagen IV konnte die endotheliale Expression von CEACAM1 in den Endothelzellen der Gefäße bestätigt werden.

Im zweiten Teil meiner Arbeit untersuchte ich die Funktion von CEACAM1 im Auge und verglich dazu wildtypische Retinae mit *Cc1<sup>-/-</sup>*-Retinae. Es zeigten sich keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen der retinalen Schichten und die anschließend durchgeführten morphometrischen Analysen der Schichtdicken der retinalen Neurone zeigte keine Anzeichen einer Neurodegeneration. Allerdings waren in *Cc1<sup>-/-</sup>*-Retinae kleine Zysten und IBA1 positive, phagozytisch aktive Zellen im subneuroretinalen Raum, also dem Bereich zwischen RPE und den Außensegmenten der Photorezeptoren zu erkennen. Die anschließend durchgeführten Expressionsanalysen immunmodulierender Faktoren und von Mitgliedern des TGF- $\beta$ -Signalwegs in retinalen und choroidealen Proben wildtypischer und *Cc1<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigten keine veränderte Expression für *Iba1*, *Ccl2* sowie *Tnf- $\alpha$* . Jedoch konnten signifikant erhöhte Werte für TGF- $\beta$ 1 in der Gruppe der 2-4 als auch der Gruppe der 9 Monate alten *Cc1<sup>-/-</sup>*-Retinae im Vergleich zu wildtypischen Retinae nachgewiesen werden. Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die Deletion von CEACAM1 unter physiologischen Bedingungen die Struktur der Retina und Choroidea nicht offensichtlich beeinflusst. Allerdings führt die Deletion zu erhöhten *Tgf $\beta$ 1* Spiegeln in der Retina und zur Aktivierung und Akkumulation von IBA1 positiven Zellen im subneuroretinalen Raum.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aumüller, G., *Anatomie*. 4. Auflage ed. 2017: Thieme.
2. A. Benninghoff, D.D., *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 2004, München: Urban & Fischer. 888 Seiten.
3. Lüllmann-Rauch, R. and F. Paulsen, *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage ed. 2012: Thieme.
4. Talos, c.b.J., *Augapfel und Sehnerv beim Menschen (Darstellung eines horizontalen Querschnitts)*. 2008.
5. Vaupel, P., H.G. Schaible, and E. Mutschler, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 7. Auflage ed. 2015: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
6. Lang, G.K., *Augenheilkunde*. 5. Auflage ed. 2014: Thieme.
7. Trepel, M., *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 6. Auflage ed. 2015: Elsevier, Urban & Fischer.
8. Reichenbach, A., et al., *Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function*. J Hirnforsch, 1995. **36**(4): p. 509-17.
9. Sarthy, V. and H. Ripps, *The Retinal Müller Cell*. 2002: Springer
10. Bringmann, A., et al., *Müller cells in the healthy and diseased retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(4): p. 397-424.
11. Bringmann, A., et al., *Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism*. Neurochem Int, 2009. **54**(3-4): p. 143-60.
12. Pow, D.V., N.L. Barnett, and P. Penfold, *Are neuronal transporters relevant in retinal glutamate homeostasis?* Neurochemistry International, 2000. **37**(2): p. 191-198.
13. Li, F., D. Jiang, and M.A. Samuel, *Microglia in the developing retina*. Neural Dev, 2019. **14**(1): p. 12.
14. Fruttiger, M., *Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(2): p. 522-7.
15. Stone, J., et al., *Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia*. J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 1): p. 4738-47.

16. Connolly, S.E., et al., *Characterization of vascular development in the mouse retina*. *Microvasc Res*, 1988. **36**(3): p. 275-90.
17. Stahl, A., et al., *The mouse retina as an angiogenesis model*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(6): p. 2813-26.
18. Beauchemin, N. and A. Arabzadeh, *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**(3-4): p. 643-71.
19. Rueckschloss, U., S. Kuerten, and S. Ergün, *The role of CEA-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in vascular homeostasis*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2016. **146**(6): p. 657-671.
20. Kleefeldt, F., *Einfluss von CEACAM1 auf die endotheliale Funktion*. 2019, Würzburg. III, 94 Blätter.
21. Kuespert, K., S. Pils, and C.R. Hauck, *CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(5): p. 565-71.
22. Beauchemin, N., et al., *Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family*. *Exp Cell Res*, 1999. **252**(2): p. 243-9.
23. Gray-Owen, S.D. and R.S. Blumberg, *CEACAM1: contact-dependent control of immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(6): p. 433-46.
24. Watt, S.M., et al., *Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site*. *Blood*, 2001. **98**(5): p. 1469-79.
25. Singer, B.B., et al., *Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94106.
26. Oikawa, S., et al., *Homotypic and heterotypic Ca(++)-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **186**(2): p. 881-7.
27. Stern, N., et al., *Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 6692-701.
28. Obrink, B., *On the role of CEACAM1 in cancer*. *Lung Cancer*, 2008. **60**(3): p. 309-12.
29. Brümmer, J., et al., *Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas*. *Oncogene*, 1995. **11**(8): p. 1649-55.

30. Najjar, S.M., *Regulation of insulin action by CEACAM1*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(6): p. 240-5.
31. Tilki, D., et al., *CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer*. Oncogene, 2006. **25**(36): p. 4965-74.
32. Ergün, S., et al., *CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 311-20.
33. Kilic, N., et al., *Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2361-9.
34. Nollau, P., et al., *Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2354-7.
35. Khairnar, V., et al., *CEACAM1 induces B-cell survival and is essential for protective antiviral antibody production*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6217.
36. Poy, M.N., et al., *CEACAM1 regulates insulin clearance in liver*. Nat Genet, 2002. **30**(3): p. 270-6.
37. Chmiela, M. and J. Kupcinskis, *Review: Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter, 2019. **24 Suppl 1**(Suppl Suppl 1): p. e12638.
38. Khairnar, V., et al., *CEACAM1 promotes CD8(+) T cell responses and improves control of a chronic viral infection*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2561.
39. Najjar, S.M., et al., *Ceacam1 deletion causes vascular alterations in large vessels*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **305**(4): p. E519-29.
40. Ergun, S., et al., *CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 311-20.
41. Gerstel, D., et al., *CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation*. Oncogene, 2011. **30**(41): p. 4275-88.
42. Horst, A.K., et al., *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1596-605.
43. Nouvion, A.L., et al., *CEACAM1: a key regulator of vascular permeability*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4221-30.
44. Ludewig, P., *Auswirkung der ceacam1- expression auf hypoxie- induzierte angioproliferative netzhauterkrankungen am beispiel der frühgeborenenretinopathie im mausmodell*. 2016.

45. Ludewig, P., et al., *CEACAM1 confers resistance toward oxygen-induced vessel damage in a mouse model of retinopathy of prematurity*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(12): p. 7950-60.
46. Han, S.U., et al., *CEACAM5 and CEACAM6 are major target genes for Smad3-mediated TGF-beta signaling*. Oncogene, 2008. **27**(5): p. 675-83.
47. Chakrabarty, S., et al., *Induction of carcinoembryonic antigen secretion and modulation of protein secretion/expression and fibronectin/laminin expression in human colon carcinoma cells by transforming growth factor-beta*. Cancer Res, 1988. **48**(14): p. 4059-64.
48. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono, *TGF-β and the TGF-β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(5).
49. Massagué, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
50. Massagué, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.
51. Böttner, M., K. Krieglstein, and K. Unsicker, *The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions*. J Neurochem, 2000. **75**(6): p. 2227-40.
52. Dünker, N. and K. Krieglstein, *Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis*. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6982-8.
53. Lawrence, D.A., *Transforming growth factor-beta: a general review*. Eur Cytokine Netw, 1996. **7**(3): p. 363-74.
54. Mummery, C.L., *Transforming growth factor β and mouse development*. Microscopy Research and Technique, 2001. **52**(4): p. 374-386.
55. Saltis, J., *TGF-beta: receptors and cell cycle arrest*. Mol Cell Endocrinol, 1996. **116**(2): p. 227-32.
56. Schuster, N. and K. Krieglstein, *Mechanisms of TGF-β-mediated apoptosis*. Cell and Tissue Research, 2002. **307**(1): p. 1-14.
57. Tucker, R.F., et al., *Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor*. Science, 1984. **226**(4675): p. 705-7.
58. Roberts, A.B., et al., *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5339-43.

59. Teramoto, T., A. Kiss, and S.S. Thorgeirsson, *Induction of p53 and Bax during TGF-beta 1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(1): p. 56-60.
60. Wahl, S.M., et al., *Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation*. *J Immunol*, 1988. **140**(9): p. 3026-32.
61. Kehrl, J.H., et al., *Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth*. *J Exp Med*, 1986. **163**(5): p. 1037-50.
62. Moulton, B.C., *Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro*. *Endocrinology*, 1994. **134**(3): p. 1055-60.
63. Choi, M.E. and B.J. Ballermann, *Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(36): p. 21144-50.
64. de Luca, A., M. Weller, and A. Fontana, *TGF-beta-induced apoptosis of cerebellar granule neurons is prevented by depolarization*. *J Neurosci*, 1996. **16**(13): p. 4174-85.
65. Braunger, B.M., et al., *TGF- $\beta$  Signaling Protects Retinal Neurons from Programmed Cell Death during the Development of the Mammalian Eye*. *Journal of Neuroscience*, 2013. **33**(35): p. 14246-14258.
66. Jensen-Jarolim, E., et al., *Crosstalk of carcinoembryonic antigen and transforming growth factor- $\beta$  via their receptors: comparing human and canine cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2015. **64**(5): p. 531-7.
67. Li, Y., et al., *Carcinoembryonic antigen interacts with TGF- $\beta$  receptor and inhibits TGF- $\beta$  signaling in colorectal cancers*. *Cancer Res*, 2010. **70**(20): p. 8159-68.
68. Derynck, R. and R.J. Akhurst, *Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(9): p. 1000-4.
69. Ross, S. and C.S. Hill, *How the Smads regulate transcription*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(3): p. 383-408.
70. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-beta superfamily*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.
71. Mathews, L.S. and W.W. Vale, *Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase*. *Cell*, 1991. **65**(6): p. 973-82.

72. Itoh, S. and P. ten Dijke, *Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 176-84.
73. Luttly, G.A., et al., *Heterogeneity in localization of isoforms of TGF-beta in human retina, vitreous, and choroid*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1993. **34**(3): p. 477-487.
74. Anderson, D.H., et al., *Distribution of transforming growth factor-beta isoforms in the mammalian retina*. *Journal of Neuroscience Research*, 1995. **42**(1): p. 63-79.
75. Kvanta, A., *Expression and secretion of transforming growth factor-beta in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells*. *Ophthalmic Res*, 1994. **26**(6): p. 361-7.
76. Tanihara, H., et al., *Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. **34**(2): p. 413-9.
77. Braunger, B.M., et al., *TGF-beta signaling protects retinal neurons from programmed cell death during the development of the mammalian eye*. *J Neurosci*, 2013. **33**(35): p. 14246-58.
78. Bialas, A.R. and B. Stevens, *TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement*. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(12): p. 1773-82.
79. Wang, X., et al., *LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-beta signalling*. *Nature*, 2013. **499**(7458): p. 306-311.
80. Schlecht, A., et al., *Deletion of Endothelial Transforming Growth Factor-beta Signaling Leads to Choroidal Neovascularization*. *The American Journal of Pathology*, 2017. **187**(11): p. 2570-2589.
81. Leung, N., et al., *Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis*. *Oncogene*, 2006. **25**(40): p. 5527-5536.
82. Stöcker, W., *Immunfluoreszenz, indirekte*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1204-1205.
83. Bachman, J., *Reverse-transcription PCR (RT-PCR)*. *Methods Enzymol*, 2013. **530**: p. 67-74.
84. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(3): p. 1559-82.

85. Jansohn, M. and A. Aigner, *Gentechnische Methoden*. 2012, München: Spektrum Akad. Verl. XXIII, 660 S.
86. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
87. Stankov, A., et al., *Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions*. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*, 2015. **36**(2): p. 141-5.
88. Bielmeier, C.B., et al., *Transcriptional Profiling Identifies Upregulation of Neuroprotective Pathways in Retinitis Pigmentosa*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(12).
89. Cherry, J.D., et al., *CCL2 is associated with microglia and macrophage recruitment in chronic traumatic encephalopathy*. *J Neuroinflammation*, 2020. **17**(1): p. 370.
90. Conductier, G., et al., *The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases*. *J Neuroimmunol*, 2010. **224**(1-2): p. 93-100.
91. Jo, D.H., et al., *Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy*. *Glia*, 2019. **67**(2): p. 321-331.
92. Balkwill, F., *TNF-alpha in promotion and progression of cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(3): p. 409-16.
93. Streilein, J.W., G.A. Wilbanks, and S.W. Cousins, *Immunoregulatory mechanisms of the eye*. *J Neuroimmunol*, 1992. **39**(3): p. 185-200.
94. Wang, N., et al., *Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 inhibits the antitumor effect of neutrophils in tongue squamous cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2019. **110**(2): p. 519-529.
95. Wang, J., et al., *Amyloid-beta up-regulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia: Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration*. *J Cell Physiol*, 2009. **220**(1): p. 119-28.
96. Fiori, V., M. Magnani, and M. Cianfriglia, *The expression and modulation of CEACAM1 and tumor cell transformation*. *Ann Ist Super Sanita*, 2012. **48**(2): p. 161-71.

97. Kilic, N., et al., *Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4223-33.
98. Gu, A., et al., *Role of Ceacam1 in VEGF induced vasculogenesis of murine embryonic stem cell-derived embryoid bodies in 3D culture*. Exp Cell Res, 2009. **315**(10): p. 1668-82.
99. Fruttiger, M., *Development of the retinal vasculature*. Angiogenesis, 2007. **10**(2): p. 77-88.
100. Saint-Geniez, M. and P.A. D'Amore, *Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 1045-58.
101. Ludewig, P., et al., *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits MMP-9-mediated blood-brain-barrier breakdown in a mouse model for ischemic stroke*. Circ Res, 2013. **113**(8): p. 1013-22.
102. Imai, Y., et al., *A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(3): p. 855-62.
103. Ohsawa, K., et al., *Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity*. J Neurochem, 2004. **88**(4): p. 844-56.
104. Mattapallil, M.J., et al., *The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(6): p. 2921-7.
105. Luhmann, U.F., et al., *The severity of retinal pathology in homozygous Crb1rd8/rd8 mice is dependent on additional genetic factors*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(1): p. 128-41.
106. den Hollander, A.I., et al., *Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 198-203.
107. den Hollander, A.I., et al., *Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12)*. Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 217-21.
108. Lotery, A.J., et al., *Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(3): p. 415-20.
109. Bulgakova, N.A. and E. Knust, *The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 15): p. 2587-96.

110. van de Pavert, S.A., et al., *Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 18): p. 4169-77.
111. van de Pavert, S.A., et al., *Crb1 is a determinant of retinal apical Müller glia cell features*. Glia, 2007. **55**(14): p. 1486-97.
112. Pellikka, M., et al., *Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 143-9.
113. Mehalow, A.K., et al., *CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(17): p. 2179-89.
114. Li, H., et al., *Role of TGF-Beta1/SMAD2/3 Pathway in Retinal Outer Deep Vascular Plexus and Photoreceptor Damage in Rat 50/10 Oxygen-Induced Retinopathy*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 4072319.
115. Chen, H.Y., et al., *The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Retinal Ganglion Cells with Hyperglycemia and Oxidative Stress*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).
116. Butovsky, O., et al., *Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia*. Nat Neurosci, 2014. **17**(1): p. 131-43.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

µg .....	Mykrogramm
µl .....	Mykroliter
µm .....	Mikrometer
µM .....	Mykromolar
A.....	Arteria
Aa.....	Arteriae
Abb.....	Abbildung
AK.....	Antikörper
Aqua dest. ....	Aqua destillata
BMP.....	bone morphogenetic protein
bp .....	<i>Basenpaare</i> , Basenpaare
BSA .....	bovine serum albumin
Cc1 .....	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1
cDNA .....	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA .....	Carcinoembryonic antigen
CEACAM .....	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules
CEACAM1 .....	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1
<i>Crb1</i> .....	crumbs cell polarity complex component 1
DAPI .....	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDSA .....	Dodecenyln-bernsteinsäureanhydrid
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DNA.....	Desoxyribonucleotidacid
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
EM .....	Elektronenmikroskopie
engl.....	englisch
eNOS.....	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
et al.....	und andere
g .....	Gramm, Gramm
GABA .....	γ-Aminobuttersäure
<i>Gapdh</i> .....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL.....	retinal ganglion cell layer
GDF.....	Growth and differentiation fact
<i>Gnb2l1</i> .....	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like

HCL	Salzsäure
HIF1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1-alpha
INL	inner nuclear layer
IPL	inner plexiform layer
l	Liter
M	Molar
M.	Musculus
MAP	mitogen-associated-protein
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNA	1-Methylnicotinamide chlorid
mRNA	messenger ribonucleotid acid
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NFL	nerve fiber layer
NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen
NGS	normal goat serum
nm	Nanometer, Nanometer
ONL	outer nuclear layer
OPL	outer plexiform layer
P	postnataler Tag
PBS	Phosphahtgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	retinopathy of prematurity
RPE	retinales Pigmentepithel
<i>Rpl32</i>	Ribosomal Protein <i>L32</i>
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	real-time quantitative Polymerase Kettenreaktion
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec.	Sekunde
SEM	standard error of the mean

TGF $\beta$  ..... transforming growth factors beta  
TGF- $\beta$ -RI .....transforming growth factors beta receptor 1  
TNF- $\alpha$  ..... Tumornekrose-Faktor- $\alpha$   
V. ....Vena  
VEGF..... vascular endothelial growth factor  
vergleiche ..... vgl.  
ZEMM..... Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin  
ZNS .....Zentrales Nervensystem

## II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Auges im horizontalen Querschnitt. ....	2
Abb. 2: Aufbau und Zelltypen der Retina.....	4
Abb. 3: Gefäßplexus der Retina und Choroidea.....	8
Abb. 4: Übersicht der Mitglieder der CEACAM-Familie. ....	9
Abb. 5: Auswahl an Funktionen von CEACAM1.....	10
Abb. 6: <i>Ceacam1</i> mRNA-Expression in retinalem und choroidalem Gewebe.....	34
Abb. 7: CEACAM1-Expression im vorderen (A) und hinteren (B) Augenabschnitt.....	36
Abb. 8: Lokalisation der CEACAM1-Expression in der Retina.....	37
Abb. 9: Knockout von CEACAM1.....	38
Abb. 10: Morphometrische und Morphologische Analysen der retinalen Schichtung von WT und <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	40
Abb. 11: Retinale Hemisphären im Überblick von 2 - 4 (A) und 9 (B) Monate alten Wildtypen und <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen. ....	41
Abb. 12: Detaillierte Aufnahmen der kleinen Zysten im subneuroretinalen Raum (A) und deren Ultrastruktur (B) bei 2 - 4 Monate alten B6.I-Wildtypen und <i>Cc1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	42
Abb. 13: IBA1 positive Zellen in der Retina.....	44
Abb. 14: mRNA Expressionslevel von <i>Iba1</i> sowie immunmodulierenden Faktoren <i>Tnf-α</i> und <i>Ccl2</i> in Retina (A) und Choroidea (B). ....	45
Abb. 15: mRNA Expressionslevel von Liganden und Rezeptoren des TGF-β- Signalweges.....	46

### III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten Reagenzien.....	15
Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	16
Tab. 3: Liste der verwendeten Geräte.....	17
Tab. 4: Liste der verwendeten Puffer .....	18
Tab. 5: Liste der verwendeten Enzyme und Kits .....	19
Tab. 6: Liste der verwendeten Antikörper.....	19
Tab. 7: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen für PCR .....	20
Tab. 8: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen für RT-qPCR .....	20
Tab. 9: Spülschritte der enukleierten Augen im Vorfeld der Paraffineinbettung .....	22
Tab. 10: Schritte der Paraffineinbettung.....	22
Tab. 11: Entparaffinierung mittels absteigender Alkoholreihe.....	23
Tab. 12: CEACAM1-Färbung mittels mCC1-Antikörper und M.O.M. ®-Kit .....	24
Tab. 13: Entwässerung des Gewebes bei der Einbettung in Epon .....	27
Tab. 14: Mastermix PCR.....	29
Tab. 15: Programm PCR – Genotypisierung.....	29
Tab. 16: Zusammensetzung der Reagenzien zur Säuberung der mRNA-Proben .....	31
Tab. 17: Zusammensetzung des 2X RT Master Mix.....	31
Tab. 18: Programm der Reversen Transkription .....	31
Tab. 19: Zusammensetzung des qPCR-Mix.....	32
Tab. 20: Programm qPCR .....	32

#### **IV Danksagung**

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

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara Braunger bedanken! Sie hat mich anfänglich zu einem experimentellen Thema überzeugt und mir dieses freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dabei hat sie mir bei allen Fragen und Hindernissen, die aufgekommen sind, immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich bin ihr sehr dankbar für diese großartige Erfahrung des wissenschaftlichen Arbeitens, die sie mir ermöglicht hat.

Bevor ich jedoch mit meiner Doktorarbeit im Institut angefangen habe, wurde meine Begeisterung für die Anatomie durch Frau Dr. rer. nat. Marion Holbach-Gutzeit maßgeblich geweckt. Ich danke ihr für die vielen motivierenden Gespräche und ihr Kontaktvermittlung zu meiner Doktormutter!

Während der Entstehung meiner Doktorarbeit haben mich zahlreiche Personen mit Rat und Tat unterstützt. Ohne diese Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank geht hierbei an Dr. Florian Kleefeldt, Dr. Verena Pfeiffer und Dr. Nikolai Kleefeldt. Zu Beginn meiner Arbeit verbrachte ich viel Zeit im Histologie-Labor bei Erna Kleinschroth, die mir mit viel Engagement bei meinem Start zur Seite stand. Zudem gilt mein Dank auch den weiteren Mitarbeiterinnen des Histologie-Labores Elke Varin und Doris Dettelbacher-Weber. Ein besonderer Dank gilt Alla Ganscher, die mich bei meinen Experimenten unermüdlich unterstützte und mich in die - für mich - komplexe Welt der mikrobiologischen Versuche einführte. Viele hilfreiche Tipps bei den immunhistochemischen Färbungen erhielt ich von Brigitte Treffny. Des Weiteren gilt mein Dank dem Team des EM-Labors um PD Dr. Nicole Wagner mit Sieglinde Schenk und Karin Reinfurt-Gehm. Für seine technische Unterstützung möchte ich Michael Christof ausdrücklich danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an 2 Frauen – meine Mutter Andrea und meine Freundin Josie, die mich zum Medizinstudium stets ermutigt haben und mich währenddessen immer unterstützten. Ohne dies wäre meine Promotion nie möglich gewesen. Josie danke ich besonders für die unzähligen Male des Korrekturlesens.

## **VI Eigene Kongressteilnahmen**

- 114th Annual Meeting / 33. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany, 25.-27.09.2019