UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik, Institut für Klinische Chemie/Zentrallaboratorien

Prof. Dr. med. Christoph Wagener

Auswirkung der CEACAM1- Expression auf Hypoxie- induzierte angioproliferative Netzhauterkrankungen am Beispiel der Frühgeborenenretinopathie im Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Peter Heinz- Josef Ludewig

aus München

Hamburg 2015

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.11.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. C. Wagener

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. U. Bartsch

Meinen Eltern

Eri(ka) und Klaus Ludewig

Inhaltsverzeichnis

1.2	Die Entwicklung des Blutgefäßsystems	
1.2	1 Molekularbiologische Grundlagen von Vaskulo- und Ang	iogenese
1	.2.1.1 Schritt 1: Der Stimulus für die Blutgefäßentwicklun	g
1	.2.1.2 Schritt 2: Vaskulogenese, Angiogenese, Differenzie	rung und Gefäßreifung
	Die VEGF- Familie	
	Mitglieder der VEGF- Familie	
	Die Rezeptoren von VEGF	
	Die Vaskulogenese - <i>de novo</i> Gefäßbildung	
	Angiogenese und Gefäßdifferenzierung	
1	2.1.3 Das ruhende Gefäß: Gefäßstabilisierung und Remo	delling
1.3	Die Entwicklung des retinalen Gefäßnetzwerkes	
1.3	1 Der Aufbau des Auges	
1.3	2 Entwicklung der Netzhautgefäße	
1	.3.2.1 Exkurs: Immunzellen und Angiogenese	
1.4	Angioproliferative Netzhauterkrankungen	
1.4	1 Die Frühgeborenenretinopathie (ROP)	
1.4	2 Die Pathogenese der Frühgeborenenretinopathie	
1	.4.2.1 Phase 1: HYPERoxie und Vaso-Obliteration	
1	.4.2.2 Phase 2 und 3: Relative HYPOxie, Neovaskularisatio	onen und Revaskularisierung
1.5	CEACAM 1	
1.5	1 Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)	
1.5	2 Die CEA- Familie	
1.5	3 CEACAM1	
1.5	4 CEACAM1 und Angiogenese	
1.6	Zielsetzung	
Ма	terial und Methoden	
21	Materialien	

2.1.2	Software	37	
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	38	
2.1.4	Material für molekularbiologische und biochemische Arbeiten	38	
2.	1.4.1 Chemikalien	38	
2.	1.4.2 Puffer & Lösungen	38	
2.1.5	Antikörper für Immunhistochemie	40	
2.1.6	Mausstämme	41	
2.2	Methoden	41	
2.2.1	Modell der Frühgeborenenretinopathie	41	
2.2.2	Präparation und immunhistochemische Färbungen der Netzhäute	42	
2.	2.2.1 Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten der Netzhaut	42	
2.2.3	Auswertung der Netzhäute von ROP- Mäusen	43	
2.2.4	Auswertung der physiologischen Gefäßreifung	44	
2.2.5	Isolierung und intravitreale Injektion CD11b- positiver Zellen	44	
2.2.6	Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau	45	
2.2.7	Statistik	45	
3 Erae	ebnisse	46	
3 1	Finfluss von CEACAM1 auf die nhysiologische Entwicklung der Netzbautgefäße	46	
5.1		40	
3.2	Einfluss von CEACAM1 auf die Frühgeborenenretinopathie der Maus	50	
3.2.1	Einfluss von CEACAM1 auf die Vaso-Obliteration in Phase 1 der ROP	51	
3.2.2	Einfluss von CEACAM1 auf die Neovaskularisation und Revaskularisation in Phase 2 und 3	3 der	
ROP	55		
3.3	Aktivierungszustand von Mikroglia während der ROP	59	
3.4	Intravitreale Injektion von CD11b- positiven Knochenmarkzellen (BMDCs)	61	
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	65	
4 Disk	kussion	66	
		00	
4.1	CEACAM1 hat keine Einfluss auf die physiologische Gefäßentwicklung der Netzha	ut_ 66	
4.2	CEACAM1 schützt vor oxidativem Stress	67	
4.3	4.3 CEACAM1 fördert Revaskularisierung und inhibiert pathologische Neovaskularisa		
	71		
4.4	CD11b und CEACAM1	72	

4	4.5 Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick	76
5	Zusammenfassung	77
6	Abkürzungsverzeichnis	
7	Abbildungsverzeichnis	
8	Literaturverzeichnis	
9	Publikationsliste	
10	Danksagung	
11	Lebenslauf	100
12.	.Eidesstattliche Erklärung	102

1 **Einleitung**

1.1 <u>Sehen – (k)ein selbstverständliches Wunder</u>

125 Millionen Stäbchen, 7 Millionen Zapfen [1], ein Verbrauch von 677 ml Blut pro Minute pro 100 g Gewebe [2] bei einem Hubraum von 6,5 cm³ und einem Gewicht von 7,5 g [1], entwickelt vor genau 543 Millionen Jahren [3] - das sind die spektakulären Daten eines Organs, das Charles Darwin schon im 19 Jahrhundert aufgrund seiner "extremen Perfektion und Komplexität" [4] bewunderte: Das Auge. Einige Wissenschaftler gehen davon aus, dass sich das tierische Leben, und damit auch der Mensch, ohne Sehsinn nicht hätte entwickeln können [3, 5, 6]. Vier Milliarden Jahre nach dem Urknall bestand das Leben auf der Erde aus einer Bakteriensuppe mit ein paar Schwämmen, Korallen und Quallen. Doch dann vor 543 Millionen Jahren, im Kambrium, explodierte das Leben plötzlich und innerhalb kürzester Zeit entwickelte sich im Prinzip die heutige Fauna mit ihren 38 Tierstämmen (siehe Abb. 1.1).



Abb. 1.1 <u>Die geologische Zeitskala</u>: Das Kreisdiagramm zeigt die verschiedenen Erdzeitalter (Ären) und Untereinheiten (Äonen) in Millionen Jahren (mya). Im sogenannten Präkambrium (**blau**, enthält die Ären Hadaikum, Archaikum und Proterozoikum), das über vier Milliarden Jahre dauerte, kommt es kaum zu größeren Entwicklungssprüngen in der Tierwelt. Erst im Kambrium (**rot**, vor 543 mya) entwickelt sich in wenigen Millionen Jahren die komplette heutige Fauna. Am Anfang des Kambriums finden sich die ersten Fossilien mit Augen. Forscher erklären daher die "kambrische Explosion" mit der Entwicklung des Sehsinns [3].

Wahrscheinlich ermöglichte der Sehsinn dieses bahnbrechende Ereignis der "kambrischen Explosion", die den Grundstein für unsere heutige Artenvielfalt legte [3], denn interessanterweise fand man bei 543 Millionen Jahre alten Fossilien die ersten rudimentären Augen.

Vier Milliarden Jahre herrschten evolutionäre Stagnation und plötzlich, mit dem Auftauchen der ersten Trilobiten mit Facettenaugen in den Urmeeren, entwickelten sich innerhalb von nur 5 Millionen Jahre alle unsere heutigen Tierstämme. Dass das kein Zufall sein kann, dachte sich auch Andrew Parker und widmete seiner "Lichtschalter- Theorie" ein ganzes Buch (*In the blink of an eye* [3]). Darin beschreibt er, wie die Entwicklung der Augen, ein Vorgang der nach Berechnung von Nilsson und Pelger [7] in nur 500.000 Jahren stattfinden kann, einen gewaltigen Evolutionsschub im Kambrium auslöste. Raubtiere konnten auf einmal ihre Beutetiere sehen und jagen und, umgekehrt, die Beute Jäger vorzeitig erkennen und fliehen. Der Sehsinn löste somit einen großen Selektionsdruck auf die damalige Tierwelt aus, der zur "kambrischen Explosion" führte (nach [3]).

Ob wir nun einem Trilobiten unser Leben verdanken oder nicht, der Sehsinn spielt für uns und unser Wohlbefinden eine sehr wichtige Rolle. Bereits der Verlust von nur zwei bis drei Quadratmillimetern Gewebe, der sogenannten "Fovea centralis", dem Ort des schärfsten Sehens innerhalb der Netzhaut, kann zu schweren Sehbehinderungen mit all seinen Konsequenzen führen, wie sozialer Isolierung [8, 9], Depressionen [10, 11] und erhöhten Sterblichkeits-[12] und Suizidraten [13], um nur einige zu nennen. Nicht verwunderlich, dass daher in einigen Umfragen der 60er und 70er Jahre [14] des Meinungsforschungsinstitutes "Gallup Organisation" Blindheit, nach Krebs und AIDS, zu den gefürchtetsten Krankheiten überhaupt zählte. So geraten in der heutigen Medizin, in der es nicht nur um nackte Überlebenszahlen geht, sondern auch Lebensqualität eine wichtige Stellung innehat, Krankheiten, die den Sehapparat betreffen, immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Natürlich hat das auch wirtschaftliche Gründe. Denn die Prävalenz von Sehbehinderungen nimmt weltweit zu [15-26], vor allem in der älteren Bevölkerung über 65 Jahre, die 80% der Neuerblindungen betrifft [27, 28]. Der Anteil dieser Bevölkerungsgruppe steigt stetig. Bereits 2050 wird ein Drittel der deutschen Bevölkerung über 60 sein und sich der Anteil der 80-Jährigen verdreifachen [29, 30]. Die Bevölkerungspyramide wird auf dem Kopf stehen (siehe Abb. 1.3) und vielleicht unser Gesundheitswesen.

Doch was heißt überhaupt Sehbehinderung? Abgesehen davon, dass es eigentlich nicht "eine Sehbehinderung" gibt, "sondern eine Vielzahl von völlig unterschiedlichen Sehbehinderungen, die sich auch vollkommen verschieden darauf auswirken, wie und was der Betroffene noch sieht" [31], hat der Gesetzgeber für Deutschland die Begriffe "sehbehindert", "hochgradig sehbehindert" und "blind" definiert [32]. Danach ist sehbehindert, wer mit Sehhilfen weniger

als 30% von dem sieht, was ein gesunder Mensch sehen kann. Das bedeutet zum Beispiel, dass ein Sehbehinderter Buchstaben, die jemand mit normaler Sehkraft bereits aus einer Entfernung von einem Meter erkennt, erst ab einer Entfernung von nur 30 Zentimetern wahrnehmen kann. Beträgt die Sehschärfe (Visus) nur noch 5% spricht man von "hochgradig sehbehindert" und ab einem Visus unter 2% von Blindheit im Sinne des Gesetzes. Genaue Zahlen wie viele Menschen von Sehbehinderungen betroffen sind, lassen sich nur anhand der Blindengeldbescheinigung erahnen, da es in Deutschland keine großen epidemiologischen Studien zum Thema Blindheit gibt. Der Deutsche Blinden- und Sehbehinderungenverband e.V. geht bei aktuell 10000 Neuerblindungen pro Jahr [33, 34] von ca. 145.000 blinden und 500.000 sehbehinderten Menschen aus, Berechnungen der WHO sogar von 1,2 Millionen betroffenen Menschen [24, 25], verteilt auf die verschiedensten Erkrankungen (siehe Abb. 1.2).



C Ursachen für Neuerblindung in Deutschland



Abb. 1.2 <u>Ursachen für Erblindung in Deutschland:</u> Bild (a) (nach [30]) zeigt die Prävalenz, Bild (b) (nach [33]) die Inzidenz von Blindheit in Deutschland und die Entwicklung in den nächsten 20 Jahren. Aufgrund des demographischen Wandels (siehe Abb. 1.3) wird die Zahl blinder Menschen von ca. 145.000 im Jahr 2010 auf knapp 180.000 im Jahr 2030 steigen. Berechnungen der WHO gehen sogar von einem noch stärkeren Anstieg der Prävalenz von Blindheit aus[24]. Bild (c) (nach [33] zeigt, durch welche Krankheiten Blindheit verursacht wird. Bemerkenswert ist, dass knapp 50% der Neuerblindungen durch vasoproliferative Retinopathien, wie Makuladegeneration und Diabetische Retinopathie, ausgelöst werden.

Das ist jedoch nur die Spitze des Eisberges, da die Anzahl von Patienten mit Erkrankungen, welche zu Erblindung führen, wesentlich größer ist. Allein an altersbedingter Makuladegeneration, der häufigsten Ursache für Erblindungen, leiden schätzungsweise 4,5 Millionen Menschen [35]. Die Hälfte der Bevölkerung über 65 zeigt pathologische Fundusveränderungen [26, 36]. Erschreckende Zahlen, die unter Berücksichtigung des demographischen Wandels nicht besser werden: Zählte man 1920 etwa 40.000 blinde Menschen [37] und 2005 bereits 145.000, gehen Berechnungen bei gleichbleibender Inzidenz und Prävalenz von einem Drittel mehr Blinden im Jahr 2030 aus [30, 38]. Schrader et al. [37] gehen daher von 3,5 Milliarden Euro Mehrkosten für das Gesundheitswesen aus, nur um die altersbedingte Makuladegeneration adäquat zu behandeln, mehr als der Augenheilkunde heutzutage pro Jahr zur Verfügung steht, indirekte Kosten nicht mit eingeschlossen. Zahlen, die einen bei Steuermindereinahmen von über 30 Milliarden in den nächsten Jahren, Zusatzbeiträgen und Eurokrise doch etwas nachdenklich werden lassen. Grund genug die Ärmel hochzukrempeln und zu versuchen diese Augenkrankheiten besser zu verstehen, um neue präventive und medikamentöse Strategien zu entwickeln.



Abb. 1.3 <u>Demographischer Wandel in Deutschland:</u> Entwicklung der Altersstruktur in Deutschland von 1950 bis 2040 (nach [29]). Das linke Bild zeigt die Bevölkerung im Jahr 1950, im rechten Bild sind die Bevölkerungspyramiden von 2010 und 2040 (schwarz) übereinander gelegt. Man erkennt eine Überschreitung der Sterberate gegenüber der Geburtenrate. 2050 wird ein Drittel der deutschen Bevölkerung über 60 sein [27,28], was die deutschen Versicherungssysteme vor große finanzielle Probleme stellen wird.

1.2 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems

Frühgeborenenretinopathie, altersbedingte Makuladegeneration, diabetische Retinopathie und Zentralvenenverschluss sind für über 50% aller Neuerblindungen verantwortlich (siehe Abb. 1.2). Ihnen gemeinsam ist, dass sie zu Erblindung durch pathologisches Gefäßwachstum führen. Im Folgenden werden daher die grundlegenden Mechanismen der Blutgefäßbildung dargestellt.

Bereits ab der dritten Entwicklungswoche hat der Embryo mit ca. 2,5 mm die Größe überschritten, um nur noch mittels Diffusion durch das mütterliche, lakunäre System der sich entwickelnden Placenta mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden [1]. Als notwendige Reaktion entstehen in der dritten Woche aus mesenchymalen Zellen, den sogenannten Hämangioblasten, Blutinseln. Die äußeren Schichten dieser Blutinseln differenzieren zu Endothelzellen, die inneren Anteile zu den ersten Erythrozyten (siehe Abb. 1.4) [39-42]. Diese Gefäßneubildung quasi "aus dem Nichts", mit dem Fachbegriff Vaskulogenese genannt [40], beginnt zunächst im sekundären Dottersack, gefolgt vom embryonalem Mesoderm und dem Haftstiel, der sich zur späteren Nabelschnur entwickelt. Bereits im Laufe der dritten Woche verschmelzen diese Blutinseln zu einem primitiven kommunizierenden Gefäßsystem [40, 43].

Bis zur fünften Embryonalwoche entwickelt sich der primäre embryonale Blutkreislauf, wobei die Gefäße der Extremitäten sowohl durch Vaskulogenese, als auch durch Aussprossen aus bereits vorhandenen Gefäßen entstehen. Diese zweite Möglichkeit der Blutgefäßbildung wird als Angiogenese bezeichnet und wurde schon im 15. Jahrhundert von Leonardo da Vinci beschrieben, der davon ausging, dass sich das Gefäßnetzwerk wie ein Baum entwickelt und aus einem Keim, Stamm, Äste und Wurzel aussprießen [44]. Angiogenese kann noch weiter unterteilt werden, zum einen in die klassische "sprossende Da-Vinci- Angiogenese", zum anderen in "intussuzeptives mikrovaskuläres Wachstum" [45]. Bei Letzterem entstehen durch Längsspaltung vorhandener Gefäße komplexe Gefäßnetzwerke [44, 46].

Durch den beginnenden Blutfluss im primären Gefäßnetz kommt es, aufgrund der hämodynamischen Veränderungen durch Blutdruck und Scherkräfte, zu physiologischen Umbauprozessen und der Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes von Venen und Arterien mit "direktionalem Blutfluss". Dieser Vorgang wird als "fetale Arteriogenese" bezeichnet [47-49]. Viele Studien gehen davon aus, dass die Determinierung zum venösen und arteriellen Endothel bereits vor der Beginn der Blutzirkulation stattfindet [50-53]. Im letzten Schritt kommt es durch Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen zur vollständigen Stabilisierung und Reifung des Blutgefäßsystems [54, 55].



Abb. 1.4 <u>Entwicklung des Blutgefäßsystems:</u> Überschreitet der Embryo eine kritische Größe, die die alleinige Versorgung durch Diffusion unmöglich macht, beginnen sich im Embryo Blutinseln (a) aus Hämangioblasten (c) zu bilden. Die Hämangioblasten differenzieren zu Erythrozyten und Endothelzellen (c). Es bildet innerhalb von vier bis fünf Wochen der primäre, embryonale Blutkreislauf (b).(a, b aus [1]; c, d nach [1]).

1.2.1 Molekularbiologische Grundlagen von Vaskulo- und Angiogenese

1.2.1.1 Schritt 1: Der Stimulus für die Blutgefäßentwicklung

Aufgrund der stark verlängerten Diffusionszeiten von bis zu 300 Sekunden [1] für Sauerstoff und Nährstoffe, bedingt durch die zunehmende Größe des Embryos zu Beginn der dritten Woche, leiden insbesondere Dottersackepithel und das Endoderm an Sauerstoffmangel [1, 56]. Um der Unterversorgung gegenzusteuern, kommt es im ersten Schritt zu einem Anstieg des Hypoxie- induzierbaren Faktor 1 (HIF1) [57], einem Transkriptionsfaktor, der die Expression einiger hundert Gene reguliert, die Angiogenese, Stoffwechsel, Zellwachstum und Differenzierung beeinflussen [58-60] (siehe Abb. 1.5). HIF1 besteht aus den zwei Untereinheiten HIF1- α und HIF1- β [61, 62]. Unter Normoxie unterliegt die α - Untereinheit, mit einer Halbwertzeit kleiner 5 min, einem schnellen Abbau im Proteasom, der die Dimerisierung der beiden Untereinheiten zum vollständigen Transkriptionsfaktor verhindert [63-65]. Hypoxie hingegen führt zur Akkumulation von HIF1- α . Durch Sauerstoffmangel kommt es zu einer verminderten Hydroxylierung von HIF1- α durch Prolyl-Hydroxylase-Domänen-Enzyme (PHD) [66], welche für die Reaktion Sauerstoff und Eisen als Cosubstrat benötigen. Mitochondrien, die 90% des Sauerstoffs in einer Zelle verbrauchen, regulieren über Cytochrom C, einem Bestandteil der Atmungskette der Mitochondrien, die Verfügbarkeit des intrazellulären Sauerstoffs. Cytochrom C bindet Sauerstoff mit höherer Affinität als die PHDs und fungiert so als positiver Verstärker der Hypoxie, indem es zytosolische Spiegel des für die PHDs wichtigen Cosubstrates Sauerstoff zusätzlich verringert. Bei Blockade von Cytochrom C mit Stickoxiden ist die Aktivität der PHDs trotz Hypoxie nur gering eingeschränkt [67, 68]. Die fehlende Hydroxylierung von HIF1A verhindert die Bindung an eine E3- Ubiquitin- Ligase mit Namen "Von Hippel- Lindau Tumorsupressor Protein" (pVHL) [64, 69, 70]. Die Ubiquitinylierung von HIF1A, die normalerweise zur Degradierung im Proteasom führt, fehlt und führt zur Stabilisierung und Translokation von HIF1A in den Nucleus. Es kommt zur Dimerisierung mit HIF1B und Bindung mit dem Coaktivator- Komplex p300/CBP [71, 72] an Promotoren bestimmter Gene mit dem Erkennnungsmotiv NCGTG, das "HIF- responsive element" (HRE) genannt wird [73-77]. Zu den wichtigsten exprimierten Genen zählen dabei der, für die Angiogenese wichtige, "vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor" (Vascular endothelial growth factor, VEGF), die "induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase" (iNOS) als Vasodilatator, Erythropoetin (EPO) zur Stimulation der Erythropoese, verschiedene Enzyme der Glykolyse, um den Organismus auf einen anaeroben Stoffwechsel vorzubereiten, und viele andere [78]. Allerdings weisen zahlreiche dieser Gene keine HRE- Sequenz auf. Mittlerweile sind viele

andere, HIF1- unabhängige, Hypoxie- induzierte Transkriptionsfaktoren bekannt [58, 79]. Als Beispiel sei hier die "Nuclear factor kappa B" (NF-κB)- Familie genannt, die aus fünf Mitgliedern besteht (NF-κB1, NF-κB2, RelA, RelB, c-Rel), deren Gemeinsamkeit die ca. 300 Aminosäuren umfassende Rel- Homologie Domäne ist. Die Aktivierung von NF-κB findet hauptsächlich bei Entzündungsreaktionen z.B. durch Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien [80], aber auch bei Hypoxie statt [81-84]. Die Folgen sind Induktion von Zelladhäsionsmolekülen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und zahlreichen proinflammatorischen Enzymen (z.B. MMP9, COX2) [85, 86] und die Aktivierung von Makrophagen, welche Einfluss auf Gefäßentwicklung haben (siehe Kapitel 1.3.2).



Abb. 1.5 <u>Der Hypoxie- induzierbare Faktor 1 (HIF1):</u> In Anwesenheit von Sauerstoff und Eisen wird die α - Einheit von HIF1 innerhalb kürzester Zeit abgebaut (1-3). Die Sauerstoff- abhängigen Prolyl- Hydroxylase- Domänen Enzyme (PHD) hydroxylieren (OH, Hydroxylgruppe) HIF-1 α (1), das daraufhin vom "Von Hippel- Lindau Tumorsupressor Protein" (VHL) gebunden wird (2). Es folgen Ubiquitinylierung von HIF-1 α und Abbau im Proteasom (3). Unter Hypoxie ist der Abbau von HIF-1 α verlangsamt, HIF-1 α kann in den Zellkern translozieren, mit HIF-1 β dimerisieren und als Transkriptionsfaktor die Expression von Hypoxie- responsiven Genen hochregulieren (4).

1.2.1.2 Schritt 2: Vaskulogenese, Angiogenese, Differenzierung und Gefäßreifung

Die VEGF- Familie

Um die Sauerstoffversorgung während der Embryogenese zu verbessern, führt HIF1 zur Induktion von Vaskulogenese und Angiogenese. Zahlreiche verschiedene Wachstumsfaktoren sind mittlerweile bekannt, die *in vitro* und *in vivo* Angiogenese induzieren. Die VEGF- Familie nimmt zusammen mit ihren Rezeptoren eine Schlüsselrolle in diesen Prozessen ein. VEGF wurde 1983 erstmals von Senger *et al.* zunächst als "vascular permeability factor" (VPF) beschrieben, aufgrund der Beobachtung, dass VPF zu erhöhter Gefäßpermeabilität bei malignem Aszites führt [87]. Mittlerweile haben die VEGF-Mitglieder und ihre Rezeptoren in der Ophthalmologie zur Behandlung proliferativer Retinopathien Einzug gefunden. Wie wichtig VEGF für die Vaskulogenese und Angiogenese ist zeigt sich daran, dass bei Mäusen schon der Verlust eines VEGF-Allels, aufgrund schwerer Defekte des Blutgefäßsystems, zum frühen embryonalen Tod (E8.5) führt [88-90].

Mitglieder der VEGF- Familie

Die VEGF-Gen-Familie ist eine Gruppe von sezernierten Glykoproteinen, die als angiogenetische und lymphangiogenetische Wachstumsfaktoren fungieren. Mitglieder der Familie sind VEGFA (im weiteren als VEGF bezeichnet), VEGFB, VEGFC, VEGFD, sowie die "placental growth factors" PLGFI und PLGFII. Während VEGFC und VEGFD die Lymphangiogenese regulieren [91], nimmt VEGFA eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Blutgefäßsystems ein. Durch alternatives Splicing des VEGFA-Gens, bestehend aus acht Exons und 7 Introns [92, 93], entstehen vier verschiedene Isoformen. Je nach Anzahl der Aminosäuren heißen diese VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 und VEGF-206 [92, 93], wobei VEGF-165 die vorherrschende Isoform ist [94]. Die verschiedenen Isoformen zeigen unterschiedliches Bindungsverhalten an Heparin und damit an die extrazelluläre Matrix (ECM). Während VEGF-121 kein Heparin bindet und damit frei löslich ist [95], sind VEGF-189 und VEGF-206 aufgrund der hohen Affinität zu Heparin fest mit der ECM verbunden [96], können aber durch Plasmin- getriggerte Spaltung am C-Terminus zu löslichen, bioaktiven Fragmenten werden [95]. Allerdings führt der Verlust Heparin-Bindungsdomäne zu einer verminderten mitogenen Aktivität [97]. Mäuse, die sogar nur die VEGF-121-Variante exprimieren, sterben innerhalb kurzer Zeit nach der Geburt [98]. Aus diesem Grund stellt VEGF-165, das in seiner Affinität zu Heparin zwischen VEGF-121 und VEGF-189 liegt und daher in löslicher als auch gebundener Form vorkommt, die optimale Mischung aus Bioverfügbarkeit und Bioaktivität dar [99-102]. Außerdem baut sich bei VEGF-165, im Gegensatz zu den anderen Varianten, ein VEGF- Konzentrationsgradient auf. Die der VEGF- produzierenden Zelle direkt anliegende ECM weist die höchsten VEGF- Konzentration auf. Da VEGF-165 weniger löslich ist wie die 121-Isoform, sind der Diffusion Grenzen gesetzt. Die VEGF-165- Konzentration nimmt daher linear ab, je weiter man sich von der Zelle entfernt. Dieser VEGF- Gradient wird im weiteren Verlauf noch eine wichtige Rolle spielen.

Die Rezeptoren von VEGF

Die Rezeptoren der VEGF- Familie (VEGF- Rezeptoren, VEGFR) wurden zuerst auf Endothelzellen (ECs), später auf Knochenmarkszellen entdeckt [102]. Es handelt sich um die Rezeptor- Tyrosin Kinasen (RTKs) VEGFR- 1("fms- like- tyrosin- kinase-1", flt-1) [103], VEGFR- 2 (Flk1, "fetal liver kinase-1)[104] und VEGFR- 3("fms- like- tyrosin- kinase-4", flt-4), die nach Bindung des Liganden dimerisieren, sich transphosphorylieren und so verschiedene Signalkaskaden in Gang setzen. Zusätzlich wird die Signaltransduktion durch zwei Korezeptoren, die Neuropiline 1 und 2 (NP1 und NP2), vor allem nach Bindung von VEGF-165 verstärkt [105-108]. Neuropiline sind eigentlich Rezeptoren für axonale Wachstumsprozesse. 1999 entdeckten Neufeld et al. die angiogenetischen Funktionen, da NP- defiziente Mäuse leichte Blutgefäßmissbildungen aufweisen [108, 109]. Die größten angiogenen, proliferativen, antiapoptotischen und permeabilitätsfördernden Stimuli gehen vom VEGFR-2 aus. VEGFR-1, obwohl phylogenetisch der "älteste" der drei Rezeptoren, wird in seiner Funktion kontrovers diskutiert, da er unter gewissen Umständen sowohl promitotische [110] als auch antiangiogene Pathways in Gang setzt. So fördert VEGFR-1 z.B. durch Rekrutierung von Monozyten die Arteriogenese und Kollateralisierung von Gefäßstenosen bei einem Model für Herzischämie [111, 112]. Eine alternative Splice-Variante des VEGFR-1 wiederum, das lösliche sFlt-1, inhibiert die Wirkung von VEGF [113]. Flt1^{-/-}- Mäuse sterben sogar präpartal [114-116]. Histologisch findet sich bei diesen Mäusen eine ausgeprägte Proliferation der Hämangioblasten und Endothelzellen, das Aussprossen der Gefäße ist durch fehlende Induktion proteolytischer Enzyme, wie der Metalloproteinase-9, blockiert [117]. Aufgrund dieser Befunde geht man daher davon aus, dass VEGFR- 1 regulatorische Funktionen hat. VEGFR- 1 und sFlt-1 sind aufgrund ihrer, im Vergleich zu VEGFR- 2, höheren Affinität zu VEGF kompetitiv wirksame Rezeptoren, die überschießende Angiogenese verhindern und die Entwicklung des Blutgefäßsystems in geordnete Bahnen lenken [118, 119]. VEGFC und VEGFD sind Liganden des VEGFR- 3 und vermitteln, wie oben erwähnt, lymphangiogene Signale.

Die Vaskulogenese - de novo Gefäßbildung

Im drei Wochen alten Embryo führen der Fibroblasten- Wachstums- Faktor FGF2 aus den endodermalen und sekundären Dottersackzellen , sowie andere Mediatoren wie z.B. der "Indian-Hedgehog-Faktor" [120], zu Differenzierung von mesodermalen Zellen zu den Hämangioblasten [121-123] und Transkription von VEGFR-2 [39-41, 44, 124], der zugleich der spezifischste und früheste Marker dieser Zellen ist. Die hypoxischen Zellen aus Endoderm und Mesoderm synthetisieren dank HIF1 nun große Mengen an VEGFA [125-127]. Dem Hypoxie-Gradienten folgt also ein VEGFA- Gradient. Die Interaktion von VEGFA/VEGFR-2 führt dann über die Proliferation der Hämangioblasten und Differenzierung zu Angioblasten und hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Bildung der oben erwähnten Blutinseln in Dottersack, Embryo und Nabelschnur [39-42]. Die Angioblasten wandern entlang des VEGF- Gradienten der ECM zum Ort ihrer Bestimmung, Differenzieren zu Endothelzellen und Bildung des primären embryonalen Gefäßplexus [128-130]. Ohne das VEGFA/VEGFR-2 System würden daher obige Prozesse wegfallen und der Embryo zwischen Tag E8.5 und E9.5 versterben [131].

Angiogenese und Gefäßdifferenzierung

Aus dem primären Gefäßplexus sprießen weitere Gefäße in die Peripherie, insbesondere in das zentrale Nervensystem, in dem keine Vaskulogenese stattfindet. Diese Vorgänge lassen sich in mehrere, sich wiederholende Schritte aufteilen. Zunächst wird die den Endothelzellen anliegende ECM durch proteolytische Vorgänge verdaut. Es folgt die Wanderung der Endothelzellen(ECs) entlang des VEGFA Gradienten. Am Zielort angekommen, folgen Proliferation, dreidimensionale Anordnung mit anschließender Bildung eines Lumens, Differenzierung und Reifung der Endothelzellen [132-134]. Grundsätzlich lassen sich zwei Möglichkeiten unterscheiden, um die fertigen organspezifischen Gefäßnetzwerke zu bilden [135]. Einerseits durch "Zurechtstutzen"(pruning) des ungeordneten primären Netzwerkes durch apoptotische Vorgänge an denen VEGFA und Signale aus den umgebenden glatten Muskelzellen und Perizyten beteiligt zu sein scheinen [136]. So hat die VEGF- Konzentration in vitro maßgeblich Einfluss auf die Gefäßdurchmesser aussprossender Gefäße [137] und die VEGF-120- defiziente Maus zeigt starke Gefäßkaliberschwankungen [138]. Andererseits entstehen die organspezifischen Netzwerke durch zielgerichtetes Dirigieren der Gefäße an die gewünschte Position, wie z.B. im ZNS und in der Retina [139, 140]. Teilweise ähnelt diese gerichtete Gefäßbildung der Entwicklung des Trachealbaumes von Drosophila [141, 142] oder den Verknüpfungen von Neuronen [143]. Bereits 1985 wurde beschrieben, dass die aussprossenden Endothelzellen ihre Gestalt verändern und fingerähnliche Fortsätze,

Filopodien, ausbilden [144]. Seit 2002 ist dieser Mechanismus näher molekular untersucht [135, 138, 145]. Innerhalb der Endothelzellen lassen sich verschiedene Populationen unterscheiden. An der Spitze der Angiogenesefront befinden sich die sogenannten Tip- Zellen, die unter anderem VEGFR-2 exprimieren. Nach Bindung von VEGFA kommt es zur Ausbildung der oben erwähnten dreidimensionalen, fingerähnlichen Filopodien und Migration entlang des VEGFA- Gradienten. Den Tip- Zellen folgen die Stalk- Zellen, die VEGFR-2 exprimieren. Anders als die Tip- Zellen, reagieren diese nach VEGFA Bindung aber nicht mit Migration, sondern mit Proliferation und Lumenbildung. Sie liefern also das Baumaterial für die sich entwickelnden Gefäßverzweigungen. Die auswachsenden Kapillarsprossen anastomosieren und bilden nach und nach ein dreidimensionales Gefäßnetzwerk, in dem nun die Differenzierung in venöse und arterielle Schenkel und Kapillaren erfolgt [146]. Bereits frühzeitig, noch vor Einsetzen der Zirkulation, lassen sich arterielles und venöses Endothel anhand molekularer Marker unterscheiden [51, 52]. Bei diesen Vorgängen hat das durch VEGF induzierte und während der Evolution hochkonservierte Notch- Signalsystem eine wichtige Funktion. Beim Menschen finden sich vier Notch- Rezeptoren sowie die 5 Liganden Jagged1, Jagged2 und Dll1, Dll3 und Dll4. Im Endothel werden dabei die Rezeptoren Notch 1 und 4 und alle Liganden bis auf Dll3 exprimiert, Dll4 nur im arteriellen Endothel [147]. Lange Zeit als wichtiger Regulator von Zelldifferenzierung bekannt [148, 149], mehrten sich die Hinweise, dass Notch die Angiogenese beeinflusst. So findet sich bei CADASIL (zerebral autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie), einer Erkrankung, die schon in jungen Jahren aufgrund von Mikroangiopathien zu Schlaganfällen führt, eine Mutation im Notch3-Gen [150, 151]. Ausschaltung von Notch und seinen Liganden in Mäusen führt zu schweren Störungen der Gefäßentwicklung, wobei sich der primäre Gefäßplexus noch entwickelt, aber im weiteren Verlauf die Entwicklung großer und kleiner Gefäße gestört ist [152-154]. Dll4defiziente Mäuse sind, ähnlich wie bei VEGF, im heterozygoten Zustand nicht lebensfähig [155, 156]. Aufgrund der Beobachtungen, dass Mutationen im Gridlock-Gene, einem Effektor von Notch, zur Nichtanlage der dorsalen Aorta beim Zebrafisch führen [157], geht man jetzt davon aus, dass durch Notch-Dll4 Interaktionen die Differenzierung zu arteriellen Endothelzellen induziert und die Arteriogenese reguliert wird [158]. Blockade der Notch- Signaltransduktion führt hingegen zur Differenzierung venöser Endothelzellen [159]. Mittlerweile existieren zahlreiche andere Moleküle, die asymmetrisch auf arteriellem oder venösen Endothel zu finden sind [160]. So wird der Eph-B4- Rezeptor (EphB4), der zur großen Familie der Eph-Rezeptor Tyrosin Kinasen gehört, nur auf späteren venösen Gefäßen, sein Ligand, das Ephrin-

B2, nur auf arteriellem Endothel exprimiert [52, 161-163]. Trotz des unterschiedlichen Expressionsort scheint die Interaktion von Rezeptor und Ligand von großer Bedeutung zu sein. EphB4- und EphrinB2-defiziente Mäuse sterben bereits in utero am Tag E9.5 [50, 164]. Das defekte Netzwerk ähnelt dem der Notch- Mutanten. Die Entwicklung bleibt auf Stufe des primären Gefäßplexus stehen. Alle Gefäße weisen ähnliche Kaliberstärken auf und es bildet sich kein hierarchisch organisiertes Gefäßsystem, die richtige Positionierung von Arterien und Venen findet nicht statt [165, 166]. Nach Identifizierung des EphB-EphrinB- Systems wurden viele weitere Moleküle gefunden, die positionelle Informationen im Gefäßsystem vermitteln [167, 168]. Und wieder zeigen sich die großen Entwicklungsähnlichkeiten des neuronalen Netzwerkes und Gefäßsystems, da viele Systeme, die axonales Wachstum regulieren, auch Gefäße an die richtige Stelle navigieren. Dazu gehören insbesondere die sezernierten Klasse-3-Semaphorine (Sema3A, 3B, 3C, 3F), die endothelial exprimierten Neuropiline und Plexine binden und repulsive Signale vermitteln [167, 169]. Ebenso wurde die Interaktion von Netrin mit seinem Rezeptor Unc5B als ein repulsives signaltransduzierendes System identifiziert [168, 170]. Schließlich wurden Robo-Slit-Interaktionen in der Kontrolle angiogener, endothelialer Funktionen beschrieben [169].

1.2.1.3 Das ruhende Gefäß: Gefäßstabilisierung und Remodelling

Nachdem sich nun ein hierarchisch gegliedertes organspezifisches Gefäßsystem mit arteriellem und venösem Schenkel sowie Kapillarbett mit direktionalem Blutfluss gebildet hat, beinhaltet das letzte Stadium der Gefäßentwicklung ein Zusammenspiel aus Gefäßstabilisierung und Anpassung an neue äußere Umstände, z.B. bei Verletzungen. Dieses Gleichgewicht aus ruhenden und wachsenden Gefäßen ist streng reguliert. Veränderungen dieser Homöostase finden sich daher häufig bei verschiedenen Krankheiten, wie Tumoren und den proliferativen Retinopathien. Das Angiopoietin-Tie-Liganden- Rezeptor- System ist einer dieser Mechanismen der Gefäßhomöostase [171]. Es handelt sich wieder um ein vaskulär exprimiertes Tyrosin-Rezeptor- Kinase- System. Angiopoietin- 1 (Ang-1) und sein Rezeptor Tie2 wirken antiapoptotisch und gefäßstabilisierend [172, 173]. Der gefäßdestabilisierende Gegenspieler dieser Ang-1-Tie2- Achse ist das Angiopoietin-2 (Ang-2) [146, 174]. Ang-2 kann bei Hypoxie in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, durch Herunterregulierung des proangiogenen Interleukins II-12 [175], Angiogenese fördern, aber auch wie z.B. im Falle des Corpus luteum Gefäßregression bewirken [176]. In einem anderen Mechanismus der Gefäßreifung penetrieren Perizyten und glatte Muskulatur mit ihren Fortsätzen die Basalmembran der Gefäße und lagern sich an die Gefäßwand an. Durch diese direkten Zellkontakte werden die Gefäße stabilisiert und das ruhende Endothel kontrolliert [54].

Innerhalb von nur fünf Wochen hat sich nach einer langen und komplizierten angiogenen Kaskade überall im Embryo *"ein ausgereiftes Gefäßbett mit ruhendem Phänotyp, das seine vaskulär homöostatischen Funktionen wahrnehmen kann"* [177], gebildet.

1.3 Die Entwicklung des retinalen Gefäßnetzwerkes

Im Zentralnervensystem (ZNS) beginnt die Gefäßentwicklung verzögert. Da die Retina entwicklungsgeschichtlich eine Ausstülpung des Prosencephalons ist, entwickeln sich dementsprechend, wie im übrigen Zentralnervensystem, die Gefäße der Netzhaut erst ab der 14. Gestationswoche bis zur Geburt. Bei Mäusen beginnt die Gefäßentwicklung der Netzhaut sogar erst ab der Geburt, weswegen sich die retinalen Gefäße der Maus zur Beobachtung angiogener Vorgänge *in vivo* eignen. Zunächst wird die gefäßfreie Netzhaut von der "Arteria hyloidea" versorgt. Diese beginnt mit Einsetzen der retinalen Angiogenese zu degenerieren. Innerhalb von nur drei Wochen bildet sich dann bei der Maus ein dreischichtiger Gefäßplexus.

1.3.1 Der Aufbau des Auges

Bevor näher auf die Entwicklung der Netzhautgefäße eingegangen wird, folgt zunächst zum besseren Verständnis der Aufbau des Auges. Auf dem Weg durch das Auge trifft das Licht zuerst auf die Hornhaut (Cornea), die mit 40 Dioptrien die größte Brechkraft des Sehapparates aufweist. Hoher Wassergehalt und parallele Ausrichtung der Kollagenfasern ermöglichen die Transparenz der Cornea. Es folgt die vordere Augenkammer, die mit Kammerwasser gefüllt ist. Das Kammerwasser dient aufgrund der hohen Glucose-, Aminosäuren- und Vitamin C-Konzentration der Versorgung von Cornea und Linse (Lens, gr.: *phakos*), da beide ohne Blutgefäße auskommen müssen. Schließlich wird das Licht noch von der Linse mit 17 Dioptrien gebrochen. Bei vollständiger Akkommodation sind sogar knapp 30 Dioptrien möglich.

Den größten Anteil des Auges nimmt der Glaskörper (Corpus vitreum) ein. Er besteht zu 99% aus Wasser, das in Kombination mit viel Hyaluronsäure und Proteoglykanen einen hohen Quelldruck erzeugt und so zur Formstabilität des Auges beiträgt. Eine periphere Verdichtung aus Kollagenfasern, die Membrana vitrea, grenzt den Glaskörper von der Basalmembran der Netzhaut (Retina) ab. In der Netzhaut endet die Reise des Lichts. Erstaunlicherweise ist der Informationsfluss in der Retina anders, als man es erwarten würde. Die Lichtsignale müssen alle Schichten (ca. 200 µm) der Netzhaut durchqueren, um an die Photorezeptoren zu gelangen. Die dort umgewandelten Signale nehmen dann den Weg wieder zurück Richtung Glaskörper bis zur Nervenfaserschicht, die als "Nervus opticus" das Auge Richtung primärer Sehrinde (Area 17) verlässt. Dort erfolgt die Verarbeitung der einzelnen Photorezeptorsignale zu einem Gesamtbild. Auch andere Regionen des Gehirns erhalten Efferenzen aus der Netzhaut, z.B. zur Regulation unseres Tag- Nacht- Rhythmus. Umgeben wird die Netzhaut von

der blutgefäßreichen Aderhaut (Choroidea) und der Lederhaut (Sklera), einer fibrösen Schicht, die das Auge in Form hält.

Die ersten Neuronen der Sehbahn sind die Photorezeptoren. Diese unterteilen sich in Stäbchen, zuständig für das Dämmerungssehen (skotopisches Sehen), und die Zapfen für Tagund Farbsehen (photopisches Sehen). Das Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen beträgt etwa 25:1. Die Verteilung der beiden Rezeptortypen variiert je nach Retinaareal. Die höchste Dichte der Zapfen herrscht in der Fovea centralis, genauer in der "Foveola". Da hier alle übrigen Schichten der Retina zur Seite verdrängt sind, kann das Licht ungefiltert auf die Zapfen treffen. Ohne die "Fovea centralis" könnte der Mensch nicht scharf sehen. Richtung Peripherie der Netzhaut nimmt die Dichte der Zapfen schnell von 145.000/mm² auf 5000/mm² ab. Die Zahl der Stäbchen hingegen steigt von 0 in der Fovea auf 160.000/mm². Zapfen und Stäbchen sind nach demselben Prinzip aufgebaut und bestehen aus Außensegment (Stratum segmentorum ext.), Innensegment (Stratum segmentorum int.) und Zellkörper (Stratum granulare int.). Der entscheidende Schritt des Sehvorgangs findet in den Außensegmenten statt. Hier ist der Sehfarbstoff, das Rhodopsin gespeichert. Rhodopsin setzt sich aus 11- cis-Retinal (Vitamin A) und Opsin, einem an das G- Protein Transducin gekoppelten Rezeptor, zusammen. Einfallendes Licht wandelt 11- cis-Retinal zu all- trans-Retinal um und aktiviert so das Rhodopsin. Es folgt die Bindung von Transducin und die α - Untereinheit dieses G- Proteins aktiviert nach Bindung von GTP eine Phosphodiesterase. Dieses Enzym baut cGMP ab, das nun nicht mehr an sogenannte zyklisch Nukleotid- gesteuerte Kanäle (cyclic nucleotide- gated channels, CNG-Kanäle) bindet. Die Kanäle schließen, Natrium kann nicht mehr in die Zelle einströmen. Die Zelle hyperpolarisiert (Gleichgewichtspotential von Kalium) und die Transmitterausschüttung (Glutamat) sistiert. Dies bedeutet zusammengefasst, dass die Photorezeptoren bei Dunkelheit Glutamat ausschütten, bei Helligkeit nicht. Die zweiten Neurone der Sehbahn sind die Bipolarzellen (Stratum nucleare internum), unterteilt in OFF- und ON- Bipolarzellen. OFF-Bipolarzellen werden durch Glutamat depolarisiert, leiten also das Signal "Dunkelheit" an die 3. Neurone, die Ganglienzellen, weiter. Verschwindet durch Lichteinfall Glutamat aus dem Synapsenspalt, werden die ON- Bipolarzellen aktiviert und vermitteln so das Signal "Helligkeit" an die dazugehörigen Ganglienzellen. In den inneren und äußeren plexiformen Schichten erfolgen dann noch komplizierte Verschaltungen zum Herausarbeiten dieser Signale, z.B. zur Kontrastverstärkung.

All diese Prozesse könnten aber nicht ohne das sogenannte retinale Pigmentepithel (RPE) stattfinden. Es handelt sich um ein einschichtiges, kubisches Epithel, das den Photorezeptoren anliegt und Teile der Außensegmente mit Fortsätzen umhüllt. Aufgrund seines hohen Gehalts an Melanosomen erscheint es dunkel. Eine Aufgabe ist der Transport von Glucose, Vitamin A und anderen Substanzen zwischen Choroidea und Photorezeptoren. Gleichzeitig werden die äußersten Schichten der Außensegmente phagozytiert und durch hohe Lichteinstrahlung reduziertes Retinol wieder zu 11-cis-Retinal oxidiert, also der Sehfarbstoff recycelt. Wie viel Energie diese Prozesse dabei erfordern, zeigen die "Leistungsdaten" der Netzhaut. Aufgrund kaum vorhandener Zellteilung phagozytiert jede einzelne Zelle des RPE im Rahmen des "Retinol-all-trans-Retinal-11-cis- Retinal"- Zyklus täglich, Außensegmente mit der Masse von ca. 5-10 Erythrozyten, und das ein Leben lang. Die Aderhaut hat mit 677 ml Blut pro Minute und 100 g eine so hohe Ruhedurchblutung wie kein anderes Organ. Otto Warburg stellte schon 1928 fest, dass der Sauerstoffverbrauch der Netzhaut fast 50% größer ist als der von Gehirn oder Niere [178, 179]. Dadurch werden die Außensegmente und das RPE Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt, die sonst nur in großen Arterien zu finden sind. Diese verhängnisvolle Mischung aus Licht und Sauerstoff kann zunächst durch die Melanosomen des RPE abgefangen werden, da diese einen großen Teil des nicht von den Photorezeptoren absorbierten Lichts auffangen. Mit zunehmendem Alter des RPE folgt eine Zunahme der photooxidativen Schäden, wodurch man erklären kann, dass die proliferativen Retinopathien, insbesondere die altersbedingten Makuladegeneration, ab einem Alter von 65 Jahren exponentiell zunehmen.



а





1.3.2 Entwicklung der Netzhautgefäße

Die grundlegenden Mechanismen der retinalen Gefäßbildung unterscheiden sich nicht von denen in Kapitel 1.2. Da bis jetzt keine VEGFR2- positiven Angioblasten in der Netzhaut entdeckt wurden [180-182], geht man davon aus, dass sowohl oberflächliche, als auch tiefe Gefäßschichten durch aussprossende Angiogenese entstehen. Nichtsdestotrotz denken einige Autoren, dass sich vor allem der innere Gefäßplexus durch Vaskulogenese entwickelt [183-185], die endothelialen Vorläuferzellen nicht gut genug charakterisiert sind [186, 187] und eventuell



Abb. 1.7 <u>Hypoxie in der Retina:</u> Die Abbildung zeigt unter Hypoxie leidende Ganglienzellen (rot). Gefärbt sind HIF1A (rot), Gefäße (Isolectin- B4- FITC, grün) und DAPI. (Maßstabsbalken, 16 μm)

zirkulierende Angioblasten [188] die Gefäßentwicklung fördern.

Aufgrund der Besonderheit, dass die Retina lange Zeit nicht vaskularisiert ist, reicht ab einer gewissen Augengröße die Versorgung durch die Arteria hyaloidea nicht mehr aus [189]. In den unter Hypoxie leidenden Ganglienzellen wird die HIF1- Kaskade in Gang gesetzt. In der Folge sezernieren die Ganglien den Platelet-Derived Growth Factor-A (PDGFS). Dieser Wachstumsfaktor wirkt im Sehnerv als starkes Mitogen auf eine Population von Astrozyten, die den dazugehörigen Rezeptor PDGFR α exprimieren. Die Zellen beginnen zu proliferieren und in die Nervenfaserschicht der Netzhaut einzuwandern. Da Astrozyten aber vor den Gefäßen die Netzhaut bevölkern, leiden sie an der schlechten Sauerstoffversorgung und beginnen VEGFA auszuschütten [190, 191]. Diese hypoxischen Zellen erkennt man an ihrer spindelzellförmigen Morphologie und an der schwachen GFAP- und Vimentin- Expression [181]. Diese Astrozyten bevölkern nach und nach die Retina und bilden ein "Honigwaben- ähnliches" Netzwerk. Es entsteht ein VEGF- Gradient, der die Aussprossung der Endothelzellen in die Netzhaut ermöglicht. Die Bedeutung dieses Gradienten zeigt sich bei der Entwicklung der retinalen Gefäße besonders gut. Intraokuläre Injektionen von VEGF führen zur Abnahme des Gradienten und zur Verlangsamung des Gefäßwachstums [135]. Passend zu diesem Befund zeigen die VEGF-120- Isoform-Mutanten, die aufgrund der höheren Löslichkeit als VEGF-165 einen kleineren VEGF- Gradienten haben, ein verlangsamtes Wachstum mit geringerer Gefäßdichte, aber dicken plumpen Gefäßen [135, 138].

Geführt durch die bereits genannten Tip-Zellen [169, 192], einer Subklasse der Endothelzellen, nimmt die nachfolgende Endothelzellenfront das "Maschendrahtzaun- ähnliche" gliale Netzwerk als Vorlage und wandert entlang der Astrozytenfortsätze [193, 194]. So bildet sich bei der Maus innerhalb der ersten Woche der oberflächliche primäre Gefäßplexus. Die Endothelzell- Astrozyten- Verbindung ist von so großer Bedeutung, dass sich nur dort Gefäße befinden, wo Astrozyten sind. Dementsprechend sind weder beim Menschen in der avaskulären Fovea centralis [195], noch in der avaskulären Netzhaut des Possums Astrozyten vorhanden [140]. Nach Kontakt mit den Endothelzellen beginnen sich die Astrozyten zu verändern. Sie nehmen die typische sternförmige Morphologie an. Die Expression von GFAP und Vimentin nehmen zu [196, 197]. Die VEGF- Spiegel sinken und verhindern ein überschießendes Gefäßwachstum [198].



Abb. 1.8 <u>Angiogenese in der Netzhaut:</u> Astrozyten bevölkern nach und nach die Retina und bilden ein "Honigwaben- ähnliches" Netzwerk an dem die Endothelzellen entlang wandern. Bild (a) zeigt das Astrozytennetzwerk (GFAP, Glial fibrillary acidic protein, rot), Bild (b) eine Tip- Zelle der vaskulären Front (Isolectin-B4- FITC, grün).

Während innerhalb der ersten Woche der primäre Gefäßplexus noch Richtung Ora serrata zieht, beginnen die zentralen Anteile des Netzwerkes bereits zu differenzieren, zu reifen und es bilden sich die tiefen Schichten der retinalen Gefäße. Stimulus ist, wie beim primären Plexus, Sauerstoffmangel der tiefer gelegenen Zellen des Stratum granulare internum. Es bildet sich ein VEGF- Gradient in vertikaler Richtung [199]. Die Gefäße beginnen nun, von den Venen ausgehend, die Netzhaut zu penetrieren [139]. Als Leitschiene benutzen sie dazu die Müller-Zellen, die hier Funktion der, in den tiefen Schichten fehlenden, Astrozyten übernehmen. Genau an der oberen und unteren Grenze der inneren nukleären Schicht (Stratum granulare internum) beginnen sie in horizontaler Richtung in die Netzhaut zu wachsen, wobei diese Prozesse sehr schlecht verstanden sind. Verschiedene Rezeptoren scheinen hier von Bedeutung zu sein. Behandelt man junge Mäuse mit R-Cadherin Antikörpern wachsen die Gefäße weiter in die Photorezeptorschicht [145]. Angiopoietin-2 defiziente bilden die tiefen Gefäßschichten erst gar nicht aus [139].

Das gebildete dreidimensionale retinale Gefäßnetzwerk ist noch sehr empfindlich. Durch Hyperoxie und damit verbundene reaktive Sauerstoffspezies, sowie niedrige VEGF- Spiegel können noch große Anteile der Gefäße zugrunde gehen [200]. Erst durch die muralen Zellen, also Perizyten und glatte Gefäßmuskulatur, sind die Gefäße vor diesen äußeren Einflüssen geschützt. Endothelzellen rekrutieren diese Zellen durch Ausschüttung von PDGFB. Gezeigt werden konnte das daran, dass Hypoxie- induzierte Vaso-Obliterationen nach intraokulärer Gabe von PDGFB zunehmen. Die muralen Zellen binden mit ihrem Rezeptor PDGFR-β das lösliche PDGFB und nicht mehr das der Endothelzellen [201].

1.3.2.1 Exkurs: Immunzellen und Angiogenese

Neben den bereits in Kapitel 1.3 beschriebenen Mechanismus der Gefäßdifferenzierung, z.B. durch VEGF und Notch, sind die Einflüsse von Immunzellen auf die Gefäße erwähnenswert. So nimmt die Zahl CD18 (β2-Integrin)-positiver zytotoxischer T- Zellen ab Tag 5 in der Netzhaut stark zu, sowie die Expression von ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, CD54) auf den Gefäßen [202]. Der grundlegende Mechanismus ist wahrscheinlich der, dass der Sauerstoffpartialdruck durch das dichte primäre Netzwerk zu hoch ist. Hyperoxie führt zur Steigerung der endotheliale Expression von ICAM-1 [203] und Bindung von Leukozyten an ICAM-1 über CD18. Die Interaktion CD18-ICAM-1 führen zur Leukozytenaktivierung [204] und FasL (Fas- Ligand)- vermittelter Apoptose der Endothelzellen. Dadurch nimmt der Gefäßdurchmesser ab, das Gefäßnetz wird deutlich feiner und die Gefahr reaktiver Sauerstoffspezies durch zu viele Gefäße kleiner. Die Blockade von CD18 führt zur Abnahme der adhärenten Leukozyten und zur Zunahme der Gefäßdichte. Der primäre Plexus bleibt plump [202].

Makrophagen gehören zum "Monozytären- Phagozyten- System" (MPS), einem wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie phagozytieren mit Hilfe unterschiedlicher Rezeptoren Fremdkörper, Infektionserreger, geschädigte Zellen und Komponenten der ECM, können aber gleichzeitig Antigene präsentieren und so das adaptive Immunsystem beeinflussen. Sie entstehen aus CD-34 positiven Vorläuferzellen, die sich im Knochenmark,

unter Einfluss der Interleukine IL-1 und IL-3 sowie M-CSF (monocyte colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte/monocyte colony stimulating factor), zu Monoblasten, Promonozyten und schließlich zu den Monozyten entwickeln [205]. Nach ungefähr 6 Tagen verlassen sie das Knochenmark, um für 12-24 Stunden im Blut zu zirkulieren [206]. Es folgt die Diapedese ins Gewebe und die Reifung zu interstitiellen Makrophagen. In einigen Organen finden sich spezialisierte Makrophagen, wie die Kupffer- Zellen der Leber, die Alveolarmakrophagen, die A- Zellen der Synovialmembran, die Osteoklasten und einige andere. So lassen sich bereits im Blut, anhand von Oberflächenmarkern, verschiedene Subpopulationen unterscheiden [207]. Neben ihrer Rolle als Immunzelle, haben Makrophagen, durch Anstoßen/Aktivierung der Angiogenesekaskade, eine große Bedeutung bei Wundheilung und Tumoren [208-211]. Gemeinsamer Nenner dieser pathologischen Zustände ist Sauerstoffmangel. Dieser führt über Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Faktoren (CCL2, VEGF über VEGFR-1) des Endothels und benachbarter Zellen zur Adhäsion der Monozyten mit anschließender transendothelialer Migration [212] und Anhäufung im hypoxischen Areal [213]. Akkumulation von HIF-1 α in den Makrophagen [214] führt über HIF- abhängige und unabhängige Wege, z.B. die NFkB- Signalkaskade, zur Adaption an die Hypoxie und Aktivierung der Makrophagen [215-218]. Dieser "hypoxische Phänotyp" [219] exprimiert, neben Enzymen für anaeroben Stoffwechsel und Chemokinen, zum Anlocken weiterer Leukozyten (Monozyten- Trapping) [219], über 30 Regulatorgene der Angionese, zumindest in vitro [213, 219]. Dazu zählen unter anderem VEGF und der VEGFR1, der zur Migration der Monozyten entlang des VEGF- Gradienten führt [212], FGF1 und Tie-2, Rezeptor des proangiogenen Angiopoietins-2 [175]. Insbesondere die Tie2- exprimierenden Makrophagen (TEMs) scheinen eine besondere Rolle in der Bildung vaskulärer Netzwerke einzunehmen, indem sie die Fusionierung der aussprießenden Tip- Zellen ermöglichen [220].



Abb. 1.9 <u>Wikroglia:</u> Durch Anderung des Aktivierungszustandes ändert sich die Morphologie von Mikroglia. (a) zeigt eine parenchymatöse, ruhende Mikroglia- Zelle mit ramifizierter Gestalt, (b) eine aktivierte Zelle mit amöboidem Phänotyp (Isolectin B4- FITC, grün).

Obwohl diese pro-angiogenen Eigenschaften der Makrophagen bereits seit den 1970ern bekannt sind, kam man relativ spät auf die Idee, dass Mikroglia, die Gewebemakrophagen des Gehirns, das Gefäßwachstum im ZNS beeinflussen. Mikroglia selbst sind eine heterogene Population, die ungefähr 12% der ZNS- Masse ausmacht [221]. Bereits in der zehnten Gestationswoche, also

noch bevor die Blut- Hirnschranke besteht, wandern die ersten Mikroglia über den ziliaren Rand der Retina in die Netzhaut ein. Sie exprimieren CD45 und MHC-1 und MHC-2 [222] und werden zu parenchymatösen Mikroglia, die sich bis zur inneren plexiformen Schicht verteilen [223] und keinen Bezug zu den späteren Gefäßen haben [224]. Morphologisch erkennt man sie an ihrer ramifizierten Gestalt, mit kleinem Zellkörper und vielen, langen Fortsätzen [224]. Auch wenn diese üblicherweise als "Ruhezustand" bezeichnet wird, mit ihren Fortsätzen scannen die Mikroglia ununterbrochen das umliegende Gewebe [225, 226]. Mikroglia stabilisieren so die Funktionen des ZNS [225].

In den ersten postnatalen Tagen, kurz bevor die Astrozyten in die Retina migrieren, wandert eine zweite Welle von Mikroglia über den Sehnerven in die Netzhaut und das restliche ZNS ein. Sie besitzen, im Gegensatz zur ersten Population von Mikroglia, Makrophagen- typische Antigene (S22 Antigen). Während der Gefäßentwicklung strecken sie ihre Fortsätze den sprießenden Gefäßen entgegen [227] und lagern sich an die entstehenden Gefäße an. Sie werden deshalb perivaskuläre Mikroglia genannt [224].

Neben der Phagozytose von pathogenen Keimen als immunkompetenten Zellen des ZNS, spielen Mikroglia bei Hypoxie eine wichtige Rolle. So akkumulieren sie beim ischämischen Schlaganfall im betroffenen Areal und in der Penumbra, wobei auch Vorläuferzellen aus dem Blut rekrutiert werden [228]. Sie haben einen neuroprotektiven Effekt auf alle umliegenden Zellen. So vergrößert sich bei transgenen Mäusen, die die Herpex-simplex-Virus Thymidin-Kinase unter dem CD11b- Promotor, der spezifisch ist für Mikroglia (und andere myeloische Zellen) exprimieren, nach Ganciclovir-Gabe das Schlaganfallareal drastisch [229]. Verantwortlich für den protektiven Effekt sind viele von den Mikroglia ausgeschütteten Wachstumsfaktoren. So sezernieren Mikroglia unter Hypoxie neuroprotektive Substanzen wie TGF-β-1 (transforming growth factor-1), ein proproliferatives und proangiogenetisches Zytokin [230], und DGNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), das Astrozyten vor dem Untergang schützt und protektiv gegen Hirnschwellung wirkt [231]. Andere ausgeschüttete Substanzen sind FGF-2 [232, 233], ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor mit vielen, unter anderem proangiogenen, Funktionen [233], und viele andere Substanzen wie Zytokine und Metalloproteinasen [234, 235].

Lange wurde spekuliert, welche Rolle Mikroglia in der Netzhaut haben. Einige gingen davon aus, dass Mikroglia die Zellreste, die während der Entwicklung der Retina entstehen, phagozytieren [236]. Eine Hypothese, die wiederlegt wurde, da retinale Zellen selbst benachbarte pyknotische Zellen phagozytieren [237]. Aufgrund der oben genannten Beobachtungen, dass Mikroglia während der Gefäßentwicklung im engen Kontakt mit diesen stehen, mit Makrophagen verwandt und bei Hypoxie wichtig sind, hält man Mikroglia, neben Astrozyten, mittlerweile für eine Schlüsselzellpopulation der retinalen Angiogenese. Einige Versuche konnten das bestätigen. So führt die Depletion von Mikroglia mit Clodronat-Liposomen zur Abnahme der Gefäßdichte [238]. Bei der Frühgeborenenretinopathie, einer Krankheit, bei der zentrale retinale Gefäße zugrunde gehen, führt die intravitreale Injektion von CD11b- und CD44- hochpositiven Zellen, die zu Mikroglia differenzieren, zur schnelleren Erholung des Gefäßnetzwerkes als bei unbehandelten Tieren [239]. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht verstanden. Man geht allerdings davon aus, dass vor allem obige Wachstumsfaktoren, also z.B. TGF- β -1, zur Gefäßentwicklung beitragen. Diese These wird dadurch unterstützt, dass HIF1-lpha defiziente Mikroglia das Gefäßnetzwerk bei der Frühgeborenenretinopathie nicht reparieren können [239], wahrscheinlich aufgrund von fehlender normalerweise HIF1- α induzierter Expression dieser Wachstumsfaktoren.

1.4 <u>Angioproliferative Netzhauterkrankungen</u>

Angioproliferative Netzhauterkrankungen stellen die angiogene Kaskade auf den Kopf. Blutgefäßwachstum ist in erster Linie ein Prozess der Embryonal-, Fetal- und Adoleszenzphase. Angiogenese ist beim Erwachsenen weitestgehend herunter reguliert und wird durch eine Vielzahl von Inhibitoren streng kontrolliert [177]. Sie findet physiologisch hauptsächlich noch in den weiblichen Reproduktionsorganen [240], bei Remodellierungsvorgängen z.B. Muskelaufbau oder bei der Wundheilung statt. Wichtig ist, dass sich bei all diesen Vorgängen pro- angiogene und anti- angiogene Faktoren in Waage halten. Kommt es zum Shift Richtung pro- angiogenen Faktoren, resultiert das, im Falle der Retinopathien, in schweren Sehbeeinträchtigungen. Der nächste Abschnitt wird sich mit der Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum, **R**etinopathy **O**f **P**rematurity, kurz ROP) beschäftigen, da es sich dabei um das Modell für unsere nachfolgenden Versuche handelt. Die übrigen proliferativen Netzhauterkrankungen, insbesondere diabetische Retinopathie und Zentralvenenverschluss, haben aber eine ähnliche Pathophysiologie. Ihnen allen liegt eine retinale Ischämie zugrunde, auch wenn die Ursachen dafür unterschiedlicher Natur sind.

1.4.1 <u>Die Frühgeborenenretinopathie (ROP)</u>

Glaubte man noch vor ein paar Jahren, dass Frühgeborene unter 350 Gramm Körpergewicht nicht lebensfähig seien, wird man heute eines besseren belehrt. Erst 2010 wurde in Göttingen ein nur 275 Gramm schwerer Junge in der 25. SSW geboren [241], 2007 ein nur 243 Gramm schweres Mädchen in der 22 SSW in Miami [242]. Limitierender Faktor ist nach wie vor die Lungenreifung. Vor der 35. Schwangerschaftswoche kann nicht genug Surfactant, das die Oberflächenspannung der Alveolen verringert, von den Pneumozyten Typ II gebildet werden. Durch Lungenreifung mit Cortison und hohen Beatmungsdrücken konnte man dieses Problem teilweise lösen, um gleich mit dem nächsten konfrontiert zu werden. Frühgeborene die viel Sauerstoff ausgesetzt werden, erblinden. Erstmals wurde das Krankheitsbild 1942 von Terry [243] beschrieben und von diesem aufgrund von Bindegewebebildung zwischen Linse und Retina als "retrolentale Fibroplasie" bezeichnet. In den darauffolgenden Jahren wurde dieses Krankheitsbild zu den häufigsten Ursachen für kindliche Erblindung, 50% aller Frühgeborenen erkrankten an diesem Krankheitsbild.[244]. 1951 konnte dann die Hyperoxie im Inkubator als wesentliche Ursache festgestellt werden [245]. Da man die Sauerstoffdrücke aber nicht beliebig herunterfahren kann, da die Babys sonst am Atemnotsyndrom versterben, erkranken 30% in Deutschland immer noch aller Frühgeborenen unterhalb der 33. Schwangerschaftswoche an der Frühgeborenenretinopathie [246].

1.4.2 <u>Die Pathogenese der Frühgeborenenretinopathie</u>

Da die Entstehung der ROP bei Mäusen besser untersucht ist und die Versuche dieser Arbeit an Mäusen stattfinden, wird die Pathogenese der ROP im Folgenden am Mausmodell erläutert. Zusammenfassend kann man zwei Phasen des Krankheitsbildes unterscheiden. In der ersten, "zerstörerischen" Phase werden Mäusejungen Hyperoxie ausgesetzt und es kommt zur Vaso-Obliteration. In der zweiten Phase kommt es zu überschießenden Gefäßbildungen, wenn die Mäuse wieder normalen Sauerstoffdrücken ausgesetzt werden [247].

1.4.2.1 Phase 1: HYPERoxie und Vaso-Obliteration

Ursachen für das Krankheitsbild sind wenngleich es auch widersprüchlich klingt, HYPERoxie und HYPOxie. Die Probleme beginnen damit, dass die Gefäße der Netzhaut bei Geburt der Mäuse (bzw. Frühgeburt beim Menschen) noch nicht vollständig entwickelt sind. Die Hypoxie der noch nicht vaskularisierten Netzhautbereiche ist aber der natürliche Stimulus für das geordnete Wachstum (siehe Kapitel 1.3.2), Hyperoxie bringt den natürlichen Verlauf durcheinander. Setzt man eine Woche alte Mäuse viel Sauerstoff aus, gehen die zentral gelegen feinen und unreifen Kapillaren zugrunde. Ursachen sind unter anderem direkte oxidative Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies [200] und die Herunterregulierung von VEGF. Hyperoxie simuliert eine vollständige Vaskularisierung der Netzhaut und führt so zur Einstellung der VEGF- Produktion durch Astrozyten. VEGF wirkt aber als "Überlebensfaktor" auf die unreifen Endothelzellen [248]. 2003 konnte Ishida et al. [202] zusätzlich noch den Einfluss von zytotoxischen T- Zellen auf die Vaso-Obliteration beschreiben. Physiologisch schützen diese Zellen während der normalen Entwicklung durch "Zurechtstutzen" der Gefäße vor Sauerstoff (siehe 1.3.2.1). Selbiges passiert auch in der Hyperoxie- Phase. Es konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb von nur sechs Stunden die ICAM-1 Expression auf den Gefäßen und die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen drastisch zunimmt und mit ihnen die Apoptose der Endothelzellen. Die Vaso-Obliterationen sind also Folge eines unglücklichen Aufeinandertreffens all dieser Faktoren.

1.4.2.2 <u>Phase 2 und 3: Relative HYPOxie, Neovaskularisationen und</u> <u>Revaskularisierung</u>

Werden die jungen Mäuse nach fünf Tagen wieder in Raumlauft gesetzt, entsteht folgendes Problem: Die in der Retina residenten Zellen sind durch Hyperoxie bedingte Vaso-Obliteration und Sistieren des Gefäßwachstums plötzlich Sauerstoffmangel ausgesetzt. In der Folge produzieren die hypoxischen Astrozyten Unmengen an VEGF, nämlich doppelt so viel wie bei der physiologischen Vaskularisierung [249], mit anschließender, chaotischer Revaskularisierung. Am Übergang von vaskulärer und avaskulärer Retina kommt es zu überschießendem Gefäßwachstum. Es bilden sich sogenannte Tufts aus, Gefäßknäuel, die in den Glaskörper hineinragen. Innerhalb von 10-15 Tagen werden diese Tufts wieder abgebaut und die Netzhaut revaskularisiert, ohne das größere Folgeschäden bleiben [247, 250], im Gegensatz zum Menschen, der daran bleibend erblinden kann.

Die Mechanismen der Neovaskularisationen sind noch nicht völlig klar. Interessanterweise findet sich im Vergleich zur normalen Vaskularisierung ein Shift hin zur murinen VEGF-164 Isoform. VEGF-164 hat höheres proinflammatorisches Potential als VEGF-120. Blockade von VEGF164 führt bei beinahe ungestörter physiologischer Gefäßbildung zur Abnahme der Neovaskularisationen [249]. Zusätzlich wird durch Blockade von VEGF-164 die Rekrutierung über VEGFR1 und die Adhäsion von Makrophagen an die neuen Gefäße verhindert [249]. Makrophagen scheinen wie bei der regelrechten Angiogenese auch an der ROP beteiligt zu sein. So geht man geht davon aus, dass Monozyten zum Abbau der Zelldebris während Phase 1 der ROP rekrutiert werden. Von der folgenden Hypoxie überrascht, beginnen sie dann VEGF-164 auszuschütten und fördern so die Bildung der Tufts, an denen sie adhärieren. Depletion von Monozyten führt im Gegenzug zur Abnahme der Neovaskularisation, bei unbeeinträchtigter Revaskularisierung [249]. Zytotoxische T- Zellen (CTL) und Mikroglia nehmen hingegen andere Aufgaben war. So führen die CTL durch Apoptose zum Abbau der Tufts, Blockade der CTL durch CD2- Antikörper verschlimmert die Neovaskularisationen. Wie in Kapitel 1.3.2.1 beschrieben, verhindern Mikroglia in Phase 1 Vaso-Obliteration und fördern die Revaskularisierung in Phase 2 [238, 239]. Mittlerweile sind viele andere Moleküle bekannt, von Omega3- Fettsäuren bis hin zum Valsartan [251, 252], und monatlich kommen mehr dazu. Und genau das ist das Ziel dieser Arbeit, ein weiteres Puzzlestück zu finden und, zu verstehen.

1.5 <u>CEACAM 1</u>

Bei dem Protein, dessen Einfluss auf die retinale Gefäßentwicklung untersucht werden soll, handelt es sich um das, mit dem <u>CarcinoEmbryonalen-Antigen</u> (CEA) verwandte, <u>C</u>ell-<u>A</u>dhäsions <u>M</u>olekül <u>1</u>, kurz CEACAM1. Da es sich um Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie handelt, setzt sich das nächste Kapitel mit dieser Familie näher auseinander, um die Struktur von CEACAM1 besser verstehen zu können.

1.5.1 <u>Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)</u>

Grundlage für die "kambrische Explosion" (siehe 1.1) war neben dem Sehsinn noch etwas anderes: Zellerkennung bzw. Zelladhäsion. Einzelne spezialisierte Zellen mussten mit Hilfe eines Oberflächenmoleküls andere Zellen erkennen, mit diesen "kommunizieren" und dann vielzellige komplexe Zellverbände bilden. Aus diesem ersten Zellerkennungsmolekül hat sich dann durch Umordnung der einzelnen Segmente (Rearrangements) im Laufe von hunderten Millionen Jahren eine ganze Familie von Proteinen mit den unterschiedlichsten Aufgaben gebildet [253]. Die Familienangehörigen dieser sogenannten Immunglobulin- Superfamilie erkennen die unterschiedlichsten Strukturen von pathogenen Keimen, wie im Falle der Immunglobuline, bis hin zu körpereigenen Strukturen, wie im Falle der zahlreichen Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs), zu denen CEACAM1 gehört. Man darf Zelladhäsionsmoleküle aber nicht als statische Bauteile verstehen. Vielmehr nehmen sie Signale aus der Umgebung wahr, leiten diese an Zellen weiter, die wiederum in der Lage sind, sich an sich ändernde äußere Verhältnisse anzupassen. Zelladhäsion vermittelt so elementare Prozesse (siehe Abb. 1.10) wie Zellproliferation und Apoptose, Zellmigration und Zielsteuerung, sowie Zelldifferenzierung und Bildung dreidimensionaler, spezialisierter Zellverbände [254]. Die Gemeinsamkeit der Mitglieder der Immunglobulin- Superfamilie ist die Immunglobulin (Ig)-Einheit. Jede dieser Ig- ähnlichen Domänen ist um die 100 Aminosäuren lang und bildet zwei β-Faltblätter aus antiparallelen β - Strängen. Stabilisiert wird das ganze durch zentral gelegene hydrophobe Aminosäuren und durch eine Disulfidbrücke [255]. Je nach Anzahl und Anordnung der β - Stränge können verschiedene Ig- Domänen unterschieden werden. Bei den Immunglobulinen unterscheidet man die variable IgV- Domäne aus neun β - Strängen, die für die Antigenbindung zuständig ist, und die konstante IgC- Domäne aus 7 β - Strängen, die die Folgereaktionen nach Antigenbindung vermittelt, so z.B. Komplementaktivierung. Bei den nicht- Immunglobulin- Mitgliedern der Superfamilie gibt es verschiedene Domänen. Aufgrund

ihrer Ähnlichkeit zu den Immunglobulin- Domänen, aber mit anderen Funktionen, werden sie IgC2-, IgV-like- und IgI- Typ genannt [256]. Man geht davon aus, dass 40% aller zellassoziierten Moleküle Ig- Domänen enthalten [257]. Im menschlichen Genom finden sich 765 Proteine mit Ig- Domänen[258], so auch CEACAM1.



Abb. 1.10 <u>Wirkung von Zelladhäsionmoleküle:</u> Erst die vielfältigen Prozesse, die durch Zelladhäsion vermittelt werden, ermöglichen das Zusammenspiel von Milliarden Zellen in einem Organismus (Abbildung nach [254]).

1.5.2 Die CEA- Familie

1965 entdeckten Gold und Freedman in Tumorextrakten aus Kolonkarzinomen ein Glykoprotein, das bis zu diesem Zeitpunkt nur mit Zelladhäsion während der Embryonalentwicklung in Zusammenhang gebracht worden war [259]. In dem Glauben, dass es sich bei dem Protein um ein onkofetales Antigen handelt, ein Molekül, das nach der Embryogenese verschwindet, in Tumoren aber reexprimiert wird, wurde das Protein als CarcinoEmbryonales Antigen (CEA) bezeichnet [259, 260]. Mittlerweile weiß man aber, dass CEA auch im normalen gesunden Gewebe gebildet wird und CEA- Serumspiegel bei nichtneoplastischen Erkrankungen, wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [261] oder bei Rauchern erhöht sind [262]. Nichtsdestotrotz hat CEA weiterhin eine wichtige Funktion bei der Verlaufsbeobachtung einiger Tumorarten, vor allem des Kolonkarzinoms [263].

Aufgrund von Sequenzhomologien und Kreuzreaktivität von CEA- Antikörpern mit anderen Antigenen stellte man fest, dass CEA zu einer ganzen Familie von Glykoproteinen gehört, die bis jetzt nur in Wirbeltieren nachgewiesen werden konnten [264]. Gen-Familien entstehen durch Duplikation eines Ausgangsgens mit anschließender Modifikation des neuen genetischen Materials [265]. Die repetitiven Sequenzen der duplizierten Gene erhöhen zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für Rekombination und Austausch von Genmaterial innerhalb einer Genfamilie während der Meiose. So können innerhalb kurzer Zeit Proteine mit ähnlichen Liganden, aber unterschiedlichen Funktionen entstehen [266]. Als Beispiel sind CEACAM1 und CEACAM3 zu nennen. Beide Moleküle binden an das Opa- Protein von Gonokokken. Bei CEACAM1 führt die Bindung der Neisserien, über Inhibition der B- Lymphozyten, zur Suppression der adaptiven Immunantwort [267]. Bindung an den Granulozyten- spezifischen Rezeptor CEACAM3, dessen zytoplasmatische Domäne, im Gegensatz zu CEACAM1, aktivierende Signale an die Zelle weiterleitet, ermöglicht hingegen die Phagozytose und Elimination der Bakterien [268, 269].

Genduplikation mit anschließender Gendiversifikation und Bildung von Gen- Familien ist also ein geschickter Schachzug der Evolution um sich ohne große Risiken an die Umwelt, im obigen Beispiel die Gonokokken- Infektion, anzupassen. Die Duplikation von CEACAM1 und die Veränderungen der zytoplasmatischen Signalmotive des neuen CEACAM3 ermöglichen die Abwehr der Gonokokken, ohne die Funktion des Ausganggens (CEACAM1) zu beeinträchtigen.
Die Bildung von Gen- Familien, von der ABC- Superfamilie bis hin zur Zink- Finger- Homeobox-Gen Familie, erklärt möglicherweise die genomischen Unterschiede unter den Säugetieren [265]

Die humane CEA- Familie findet sich in einem Cluster aus 29 Genen (19 Gene in der Maus und sieben Gene in der Ratte) auf Chromosom 19q13.2 [260] und wird in die Subgruppen der CEACAMs (**CEA-r**elated **c**ell **a**dhesion **m**olecules) und PSGs (**P**regnancy- **s**pecific **g**lykoproteins) unterteilt [264]. Im Menschen finden sich noch 11 Pseudogene [270].

Mittlerweile konnten 20 verschiedene GPI- verankerte (nur bei Primaten und Schweinen [266]), transmembranöse und sezernierte CEACAMs beschrieben werden [271], darunter zwölf humane CEACAMs (CEACAM 3-8 exklusiv beim Menschen, CEACAM5 entspricht CEA) und 15 CEACAMs bei der Maus (CEACAM2 ist mausspezifisch, CEACAM9-15 und CEACAM17 sind nagerspezifisch [272]) [271]. Darüber hinaus sind bei Ratten, Primaten und Meerschweinchen Mitglieder der CEA- Familie bekannt und es ist anzunehmen, dass die Anzahl noch steigen wird [271, 273, 274]. Alle Mitglieder der CEACAM- Subgruppe gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und ähneln sich in ihrem Bauplan. Sie setzen sich aus einer N- terminalen IgV-like-Domäne (N- Domäne) zusammen, gefolgt von einer variablen Anzahl zweier verschiedener IgC-2 Domänen (A oder B- Domänen).

Die Mitglieder der CEA- Familie vermitteln durch homo- oder heterophile Interaktionen Zelladhäsion und nehmen so wichtige physiologische Aufgaben wahr, die am Beispiel von CEACAM1 näher betrachtet werden sollen.

1.5.3 <u>CEACAM1</u>

1976 konnten Svenberg *et al.* in Gallengängen aufgrund der Kreuzreaktivität mit CEA-Antikörpern ein neues Mitglied der CEA- Familie identifizieren [275, 276], das interzelluläre Adhäsion zwischen Hepatozyten vermittelt [277]. Diese Glykoprotein hat seit seiner Entdeckung zahlreiche Namen erhalten (BGP, CD66a, NCA 160, C-CAM, H4A, pp120). Seit der Erneuerung der Nomenklatur der CEA-Familie wird das Protein CEACAM1 genannt [264]. Aufgrund der von Sequenzvergleichen und der Tatsache, dass CEACAM1 in beinahe allen untersuchten Spezies zu finden ist, nimmt man an, dass CEACAM1 der älteste Vertreter der CEA- Familie ist [266, 278]. Während z.B. CEA selektiv auf Epithelien, insbesondere des Kolons, oder CEACAM3 nur auf humanen Granulozyten exprimiert wird, zeigt CEACAM1 die weiteste Verbreitung aller CEACAMs [279, 280]. Neben Epithelien des Gastrointestinal- und Harntraktes, der Prostata, der Cervix und des Endometrium, verschiedener Drüsen und Plattenepithelien, findet es sich auf Endothelzellen verschiedener Organe. Zusätzlich wird CEACAM1 auf Immunzellen, wie Mikroglia, Makrophagen, B- und T- Lymphozyten, "Natural Killer"-Zellen, dendritischen Zellen und Granulozyten, exprimiert [281, 282].

CEACAM1 interagiert mit sich selbst, sprich ein CEACAM1 der einen Zellen bindet das CEACAM1 einer benachbarten Zelle. Diese Art der homophilen Interaktion wird als Bindung "in trans" bezeichnet. Darüber hinaus können CEACAM1- Moleküle einer Zelle untereinander Verbindungen eingehen, sogenannte laterale oder cis- Bindungen [278]. Dabei scheint ein fließendes Gleichgewicht zwischen monomeren, dimeren und heterodimeren Formen zu bestehen, wobei durch Calmodulin hervorgerufene, hohe intrazelluläre Calciumspiegel zur Dissoziation der CEACAM-Dimere führen [278]. Homophile trans- Bindungen hingegen führen gleichzeitig zu einem Anstieg der CEACAM1- Dimere[283]. Zusätzlich wurden heterophile Bindungen mit CEACAM5 und CEACAM6 beschrieben[280].

Das vollständige Protein mit einer Länge von 521 Aminosäuren (siehe Abb. 1.11) besteht aus vier extrazellulären Domänen. Die Membran- distal gelegene bzw. N-terminale, ist eine IgV-like Domäne, die innerhalb der CEA- Familie hochkonserviert ist und sowohl für die trans-, als auch die cis- Bindung verantwortlich zu sein scheint [284]. Es folgen drei IgC2- Domänen mit starker Glykosilierung.



Abb. 1.11 Aufbau und Struktur von CEACAM1 und seinen Splicevarianten (aus [285])

Die Glykosilierung kann dabei bis zu 50% des Molekulargewichts von CEACAM1 ausmachen. Dem extrazellulären Anteil schließt sich ein transmembraner und ein zytoplasmatischer Teil an. Mittlerweile sind zwölf Splice- Varianten des humanen CEACAM1 bekannt, die sich in Anzahl der extrazelluläre Domänen, Länge des zytoplasmatischen

Schwanzes und Vorhandensein des transmembranen Teil unterscheiden. Das vollständige Protein hat vier extrazelluläre Domänen und einen langen zytoplasmatischen Teil und wird dementsprechend CEACAM1-4L(ong) genannt. Das Gegenstück dazu ist CEACAM1-4S(hort). Bei diesen beiden Varianten handelt es sich gleichzeitig um die häufigsten Isoformen. Sie werden häufig coexprimiert, wobei sich das Verhältnis der beiden Formen von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden kann. Gerade die Variationen des intrazellulären Teiles sind interessant. CEACAM1- S besitzt nur einen zehn Aminosäuren langen, zytoplasmatischen Anteil, ohne phosphorylierbare Aminosäuren. Allerdings können Calmodulin, Tropomyosin und Aktin daran binden und so das Zytoskelett beeinflussen [286]. Im Gegensatz dazu ist bei der L- Form die zytoplasmatische Domäne 70 Aminosäuren lang und enthält mehrere Serin-, Threonin- und Tyrosinreste. Zwei dieser Tyrosinreste finden sich in zwei 13 Aminosäuren langen Sequenzen, die als ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) bezeichnet werden. ITIMs finden sich intrazellulären Anteil vieler Rezeptoren des Immunsystems. Nach Bindung des Liganden, werden die Tyrosinreste der ITIMs durch Src- (engl. Sarcoma) Kinasen phoshoryliert. Es folgt dann z.B. die Bindung von Phosphatasen SHP1 und SHP2, die mit ihren SH2- (Src Homology 2) Domänen phosphorylierte Tyrosinreste erkennen, so aktiviert werden und inhibitorische Signale, wie verminderten Calcium-Einstrom und Kontrolle des Zellzyklus, vermitteln. SHP1 und SHP 2 scheinen dabei bevorzugt an in cis dimerisiertes CEACAM1-L zu binden, wobei diese Bindung wiederum durch homophile trans- Bindung gefördert wird. Dagegen bindet monomeres CEACAM1- L oder cis-Bindungen von CEACAM1-L und CEACAM1-S SHPs schlechter [283]. CEACAM1-L interagiert wie CEACAM1-S außerdem mit Proteinen des Zytoskeletts, wie Aktin, Paxillin, Tropomyosin, Talin und Filamin A, sowie mit dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor), dem Insulinrezeptor und Integrin β 3 in einer vom Phosphorylierungsstatus seines zytoplasmatischen Teils abhängigen Weise. Da auf der Zelle aber zwischen den Isoformen ein ständiges Gleichgewicht herrscht, ist die Signalübertragung durch CEACAM1-L nicht einfach aus oder an, sondern kann viel feiner reguliert werden [283, 284]. Das Vorhandensein von inhibitorischen Motiven in der zytoplasmatischen Domäne und viele Untersuchungen weisen in die Richtung, dass CEACAM1 ein inhibitorisches Molekül ist. CEACAM1- Antikörper bewirken in epithelialen Zelllinien den Wiedereintritt in den Zellzyklus [287], die Expression von CEACAM1 in NIH3T3 Fibroblasten hemmt die proliferativen Stimuli von Insulin[288]. Mehrere Studien zeigten einen Einfluß der Stimulation von CEACAM1 auf die Funktion von T-Zellen, auf deren Oberfläche

CEACAM1 aktivierungsabhängig exprimiert wird. Hier bewirkte CEACAM1 die Inhibition

der zytolytischen Funktion von intestinalen intraepithelialen CD8+-T-Zellen [289]. Transfektionsstudien konnten CEACAM1 zudem als Tumorsupressor identifizieren[290], was die verminderte Expression von CEACAM1 in einigen Tumoren erklärt.

In direktem Zusammenhang mit der Zellproliferation steht Zelldifferenzierung. Wenn eine sich teilende Vorläuferzelle in eine reife funktionale Zelle umgewandelt werden soll, muss dafür zuerst die Zellteilung eingestellt werden. Deshalb passt die inhibitorische Wirkung des

CEACAM1 auf die Zellproliferation gut zu dem fördernden Einfluss, den es auf die Differenzierung verschiedener Zelltypen hat. So konnte eine essentielle Rolle für CEACAM1 bei der Differenzierung von MCF10F-Brustdrüsen-Epithelzellen gezeigt werden [291]. Diese Zellen reifen *in vitro* bei Wachstum in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix zu tubulären Strukturen unter Ausbildung einer apikal-basolateralen Polarisierung. Ein ähnliches System der Zellpolarisierung stellt die Angiogenese, d.h. die Entstehung von Blutgefäßen aus Endothelzellen, dar.

Allerdings finden sich auch aktivierende Signale von CEACAM1. So konnte eine Stimulation von T- Zellen durch CEACAM1- Antikörper hervorgerufen werden [282, 292], auf einigen Tumoren ist CEACAM1 hochreguliert und unterstützt die Invasion von Trophoblasten [293] sowie die Metastasierung beim malignem Melanom [294]. Vermutlich werden die proliferativen Stimuli durch ein Shift hin zur CEACAM1-S- Isoform ausgelöst, da sich im invasiven Adenokarzinom der Lunge eine höhere Expression von CEACAM1-S im Vergleich zum gesunden Gewebe findet [295] und die SHPs schlechter an die ITIMs von CEACAM1-L binden, wenn diese mit CEACAM1-S dimerisieren [283].

Zusammenfassend ist CEACAM1 ein multifunktionales Signalmolekül, dass durch Zell-Zellkontakte viele physiologische Vorgänge reguliert [278].

Dazu zählen Vaskulogenese [296], Angiogenese [297-299] und Lymphangiogenese [297], Immunmodulation [300] durch Regulierung von T- Lymphozyten [289], B- Lymphozyten [301], Monozyten [297], dendritischen Zellen [302] und Granulozyten [303], Apoptose [304], Epithelzellpolarisierung [291], Regulation des Insulinstoffwechsels und Hemmung der mitogenen Wirkung von Insulin [305]. Andrerseits ist CEACAM1 Rezeptor für verschiedene Pathogene wie Meningokokken, Gonokokken [306] oder das Maus- Hepatitis- Virus [307]. Fehlregulierung der CEACAM1- Expression wird bei der Tumorentwicklung beobachtet [308].

1.5.4 <u>CEACAM1 und Angiogenese</u>

Grundlage der komplexen Mechanismen der Gefäßbildung (siehe 1.2 und 1.3) sind eine funktionierende Kommunikation der aussprießenden Endothelzellen untereinander sowie mit ihrer Umgebung, sodass naheliegt, dass Zelladhäsionsmoleküle der CEA- Familie an Vaskulogenese und Angiogenese beteiligt sein könnten. 1997 stellte man fest, dass Antikörper gegen PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, CD31) Angiogenese *in vitro* hemmen können. Das interessante daran ist, dass sich PECAM1 und CEACAM1 von der

Struktur und Signaltransduktion sehr ähneln [296]. Schließlich konnte CEACAM1 histologisch auf endothelialen Zellen von Maus, Ratte und Mensch, sowie auf neu entstehenden Gefäßen von Wunden und Tumoren nachgewiesen werden [279, 309]. Die ersten ausführlichen Versuche zum angiogenen Potential von CEACAM1 lieferten Ergün et al.[299]. Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von humanen dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) mit VEGF zum Anstieg der CEACAM1- Expression führte und Zugabe von aufgereinigtem CEACAM1 aus Granulozyten einen proliferativen Effekt auf die HDMEC- Zellen hatte. Zudem wurden die HDMECs zur Migration und Bildung von Endothelröhren (tube formations) angeregt. Interessant ist, dass der Vorgang der "Tube-formation"- Bildung in Anwesenheit von VEGF durch CEACAM1 Antikörper gestoppt werden konnte. Ergün et al. bezeichneten deswegen CEACAM1 treffend als einen der ersten Effektoren von VEGF. Die Rolle von CEACAM1 bei der Lumenbildung konnte an der Brustdrüse gezeigt werden. Dort vermittelt CEACAM1 durch Apoptose und Organisation des Zytoskeletts die Bildung von Drüsenstrukturen, den Azini [310]. Die Beobachtungen, dass CEACAM1 sowohl luminal als auch aluminal exprimiert wird, führten zu der Annahme, dass CEACAM1 außerdem den Kontakt zu extrazellulären Matrix vermittelt. Die Hypothese wird dadurch gestützt, dass CEA- Antikörper die Adhäsion von Kolorektalen Karzinomen auf einer Kollagen I Matrix verringern. Des Weiteren scheint CEACAM1 bei der Invasion von Endothelzellen involviert zu sein, da Throphoblast CEACAM1 exprimiert. Zusammengefasst vermittelt endotheliales CEACAM1 in vitro alle wichtigen Vorgänge der Blutgefäßbildung.

Andrerseits hat epitheliales CEACAM1 einen angiostatischen Effekt. So führt Überexpression von CEACAM1 in der Prostatazellinie DU- 145 zur Blockade von Endothelzellproliferation[311]. Gleichzeitig führt epithelialer Verlust von CEACAM1 über eine Zunahme von VEGF zur verstärkten Neovaskularisationen.

All diese Befunde zeigen, dass CEACAM1, zumindest *in vitro*, an allen Stufen der Gefäßentwicklung beteiligt ist, von der Angiogenese bis zur Arteriogenese. Zusätzlich kommt es zur Hochregulierung von CEACAM1 bei Hypoxie und anderen pathologischen Zuständen. Somit ist CEACAM1 ein potentieller Einflussfaktor auf das Mausmodell der Frühgeborenenretinopathie, da dort all diese Zustände anzutreffen sind.

1.6 Zielsetzung

Die Netzhaut der Maus ist ein besonders gutes Modellorgan, um Angiogeneseprozesse und Einflussgrößen auf diese *in vivo* zu beobachten. Da CEACAM1 wichtig für die Angiogenese ist, sollte daher im ersten Schritt dieser Arbeit untersucht werden, wie sich der Verlust von CEACAM1 auf die physiologische Gefäßentwicklung in der Netzhaut auswirkt. Folgende Fragen standen dabei im Vordergrund:

- 1. Führt der Verlust von CEACAM1 in *Ceacam1^{-/-}* Mäusen zu einer Störung oder Verzögerung der physiologischen, retinalen Gefäßentwicklung?
- Unterscheidet sich das retinale Gefäßnetzwerk in ausgewachsenen Ceacam1^{-/-} Mäusen von dem in Kontrolltieren?

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von CEACAM1 auf das Modell der Frühgeborenenretinopathie in der Maus. Bei der Frühgeborenenretinopathie werden durch Hyperoxie und relative Hypoxie apoptotische Vorgänge mit Gefäßuntergang und anschließenden Neo- und Revaskularisierungsprozessen in Gang gesetzt. Gerade unter diesen Bedingungen wird CEACAM1 hochreguliert, wodurch sich die Frage stellt, ob ein Verlust von CEACAM1 in *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen

- 1. zu vermehrter Vaso-Obliteration,
- 2. zu vermehrten pathologischen Neovaskularisationen,
- 3. und zu einer Verlangsamung der Revaskularisierung führt.

Um einen möglichen Erklärungsmechanismus für die gefundenen Beobachtungen zu finden, beschäftigt sich der letzte Abschnitt dieser Arbeit mit den Mikrogliazellen. Neben dem Endothel sind Mikroglia die einzigen, natürlicherweise vorkommenden Zellen des ZNS, die CEACAM1 exprimieren. Zusätzlich wirken Mikroglia protektiv auf das Gefäßnetzwerk während der Frühgeborenenretinopathie, sodass CEACAM1 möglicherweise über diese Zellen seine angiogenen Effekte vermittelt. Um diese Möglichkeit näher zu beleuchten, beschäftigt sich der letzte Teil dieser Arbeit mit der Frage, ob CEACAM1 die Aktivität und Aufgaben von Mikroglia reguliert.

2 Material und Methoden

2.1 <u>Materialien</u>

2.1.1 Laborgeräte

Analysewaagen Mettler 160 MXX612, MXX2001 Agarosegele und Kammern Cambrex FashGel[™] System Autoklaven Mikroskope Mikroskop Leica CTR 5000 Mikroskopkamera DFC 360 Fx Mikroskopkamera DFC 290 Mikroskop Zeiss Axiovert 135 Mikrotom PCR- Gerät: MiniCycler TM pH- Meter Sterile Werkbank Sauerstoffsonde ProOX Sauerstoffkammer A-66274 Zentrifuge Megafuge1.0R Eppendorf Tischzentrifuge

Mettler- Toledo GmbH, Gießen Denver Instrument GmbH, Göttingen Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Tecnomara, Fernwald Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Carl Zeiss MicroImaging GmbH Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH **MJ** Research Beckman, München Flow Laboratories, Meckenheim Biospherix Ltd, NY 13083 Biospherix Ltd, NY 13083 Heraeus, Sepatech Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Software

Adobe Photoshop CS3 Fovea Pro Mikroskopsoftware LAS AF6000 Adobe, San Jose, CA 95110 Reindeer Graphics, Asheville, NC

Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einbettschalen (Tissue Tek Cryomold)	Sakura, Finetek, Zoeterwoude, NL
Kanülen	Braun, Melsungen
Messer für Kryostat	Leica, Nußloch
Objektträger für IHC (Superfrost)	R. Langenbrinck, Teningen
Polystyrene Multidishes (6-, 24-, 48- Well)	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Braun, Melsungen
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ 07417
Sterilfilter (0,22 μm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellsiebe (Cell Strainer, 70 μm, steril)	BD, Franklin Lakes, NJ 07417
Zellsiebe (Pre- Separation Filters, 40 μ m, steril)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zentrifugenröhrchen (Falcon, 15 ml, 50 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ 07417

2.1.4 Material für molekularbiologische und biochemische Arbeiten

2.1.4.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen *Fluka* (Neu-Ulm), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) oder *Sigma* (Deisenhofen) bezogen.

2.1.4.2 Puffer & Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt. Für das Arbeiten mit Zellen wurden die Medien und Lösungen steril-filtriert (Porengröße 0,22 μ m).

10x PBS (Phosphate Buffered Saline) 80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na₂HPO₄ 2,4 g KH₂PO₄ 1 l dH₂O pH 7,4

<u>Tris-HCl:</u> 1 M Tris-HCl pH 8,0 Pblec- Basis- Puffer PBS pH 6,8 1 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂ 1% Triton X-100

PbLec-Blocking Puffer Pblec- Basis- Puffer 5% BSA

<u>PbLec- Antikörper- Puffer</u> Pblec- Basis- Puffer 0,5% BSA

<u>Kryo- Blocking- Puffer</u> PBS 1% BSA

Kryo- Antikörper- Puffer 0,01% Tween 20 0,1% BSA 1 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂

Zellisolierungspuffer PBS 0,1% BSA 2 mM EDTA

 $\label{eq:trypanblaulosung} \frac{Trypanblaulosung}{0,5 g Trypanblau/100 ml H_2O} \\ 0,9 g NaCL/ 100 ml H_2O \\ \end{tabular}$

2.1.5 Antikörper für Immunhistochemie

Primärantikörper	Spezies	Verwendung/	Herkunft
		Verdünnung	
anti- IBA1 pAK	Kaninchen	IHC/ 1:100	Proteintech Group
Isolectin GS-IB ₄	Griffonia simplicifolia	IHC/ 1:500	Invitrogen GmbH
Alexa Fluor- 488			
Isolectin GS-IB ₄ -	Griffonia simplicifolia	IHC/ 1:500	Invitrogen GmbH
Biotin-XX Konjugat			
Anti-"Glial Fibrillary	Kaninchen	IHC/ 1:100	DAKO
Acidic Protein" pAK			
P1 anti- CEACAM1	Kaninchen	IHC/ 1:1000	Dr. Andrea Horst,
рАК			UKE, Hamburg
Anti- HIF1α pAK	Kaninchen	IHC/ 1:500	Abcam
CD11b- Microbeads	Ratte	MACS/ 10 μl	Miltenyi Biotec
		Microbeads pro 10 ⁷ -	
		Zellen	

Tab. 2-1 Auflistung der verwendeten Primärantikörper bzw. Lektine

Sekundärantikörper	Verwendung/	Herkunft
	Verdünnung	
Esel- Anti-	IHC/ 1:300	Dianova
Kaninchen-Cy5		
Schwein- Anti-	ICH/ 1:300	DAKO
Kaninchen Biotin-XX		
Konjugat		
Streptavidin- Cy3	IHC/ 1:300	Jackson Immuno
		Research
Streptavidin-	ICH/ 1:300	Mobitec
Alexa488		

Tab. 2-2 Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper und Nachweisreagenzien

2.1.6 Mausstämme

C57BL/ 6J= B6.WT	Hintergrundstamm der Ceacam1- defizienten	
	Mäuse, Kontrolltiere für die Versuche.	
B6. <i>Ceacam1^{-/-}</i>	Ceacam1- defiziente Mäuse durch Deletion der	
	ersten beiden Exons im Ceacam1 Gen (Leung et	
	al., 2006)	
UBI-GFP/BL6.WT	C57BL/6 Mäuse exprimieren GFP unter	
	Kontrolle des humanen Ubiquitin C Promotor.	
	(Schaefer et al.[312], 2001)	

UBI-GFP/BL6.*Ceacam1*^{-/-} C57BL/6 *Ceacam1*- defiziente Mäuse exprimieren GFP unter Kontrolle des humanen Ubiquitin C Promotor.

2.2 <u>Methoden</u>

2.2.1 Modell der Frühgeborenenretinopathie

Die Frühgeborenenretinopathie wird in den B6.*Ceacam1^{-/-}-* und Kontrollmäusen nach dem Protokoll von Smith *et al.* [247] induziert (siehe Abb. 2.1):

- Die Sauerstoffsonde (Biospherix Ltd.) wird mit Raumluft (21% Sauerstoff) und mit 75% Sauerstoff geeicht. Die Sauerstoffsonde reguliert den Zufluss von 100% Sauerstoff und Raumluft so, dass in der Sauerstoffkammer (Biospherix Ltd.) eine Sauerstoffanreicherung von 75% erreicht wird.
- Der Mäusekäfig mit den sieben Tage alten Mäusejungen und der Mutter wird in die Sauerstoffbox transferiert.
- 3. Die Anzeige der Sauerstoffsonde wird regelmäßig überprüft.
- 4. Nach fünf Tagen wird der Zufluss des 100%igen Sauerstoffes gestoppt. Einzelne Ventile in der Sauerstoffkammer werden geöffnet und innerhalb einer Stunde sinkt der Sauerstoffspiegel auf 21%. Danach können die zwölf Tage alten Mäuse aus der Sauerstoffkammer entnommen werden.

2.2.2 Präparation und immunhistochemische Färbungen der Netzhäute

Je nach Fragestellung werden die retinalen Gefäße am Tag 12, 17 oder 19 analysiert. Da beim Menschen gezeigt werden konnte, dass Untergewicht ein Risikofaktor für eine schwere Verlaufsform der Frühgeborenenretinopathie ist, wird bei den Mäusen nach Gewicht stratifiziert. Für die Tag 12-, 17-, 19- Analysen werden nur Mäuse mit einem Mindestgewicht von 4,5 g, 5,5 g und 6 g zugelassen. Mäuse mit Mikrophthalmus werden aus den Analysen ausgeschlossen.

Die Mäuse werden mittels Isofluran betäubt, dekapitiert und enukliiert. Zur Erleichterung der Präparation werden die Augen 15 min bei Raumtemperatur in 4% PFA vorfixiert.

Anschließend werden die Netzhäute vorsichtig unter dem Mikroskop freipräpariert.

Es folgen eine Nachfixierung in 4% PFA bei Raumtemperatur für 45 min, sowie eine Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 20 min bei -20°C.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern, werden die Netzhäute eine Stunde mit PbLec-Blocking Puffer blockiert. Nach drei Waschschritten mit PbLec-Basis-Puffer werden die verschiedenen Färbungen durchgeführt(modifiziert nach [251]):

- Die Netzhäute werden mit den Primärantikörpern in PbLec-AK-Puffer für zwei Tage bei 4°C inkubiert (Gelabelte Antikörper: FITC-Isolectin B4, 1:100; Biotin- Isolectin B4, 1:100; Ungelabelte Antikörper: Anti-IBA1, 1:100).
- 2. Anschließend folgen drei Waschschritte in PbLec-Basis-Puffer für je 30 min.
- Eintägige Inkubation der Retinae mit dem Sekundärantikörper in PbLec-AK-Puffer bei 4°C (Esel- Anti- Kaninchen-Cy5, 1:300)
- Nach drei Waschschritten f
 ür je f
 ünf Minuten in PbLec-Basis-Puffer und ddH₂O, werden die Netzh
 äute, mit den Photorezeptoren nach unten gerichtet, auf Objekttr
 ägern mit Eindeckmedium eingedeckelt.

2.2.2.1 Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten der Netzhaut

Zur Herstellung von Gefrierschnitten werden zunächst Hornhaut und Linse der Augen entfernt. Anschließend folgt eine 24- stündige Fixierung in 4% PFA und eine Entwässerung in einer aufsteigenden Sucrose- Reihe (5%, 10%, 15%) für je einen Tag. Der Augenbecher wird in O.C.T. eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einem Kryostaten werden Gewebeschnitte von 20 µm Dicke hergestellt. Die Gewebeschnitte werden in eine 24- Well-Platte mit PBS transferiert, um das Einbettmedium zu entfernen. Es folgt eine Inkubation mit Kryo- Blocking- Puffer für 30 min bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschritten mit PBS für je 5 min, werden die verschiedenen Färbungen durchgeführt:

- Die Netzhautschnitte werden mit dem Primärantikörper in Kryo- Antikörper- Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert (Gelabelte Antikörper: FITC-Isolectin B4, 1:100; Biotin-Isolectin B4, 1:100; Ungelabelte Antikörper: Anti-CEACAM1, 1:1000)
- 2. Anschließend folgen drei Waschschritte in PBS für je 30 min.
- 3. 30 minütige Inkubation der Retinaschnitte mit dem Sekundärantikörper und DAPI in Kryo- Antikörper- Puffer bei Raumtemperatur (Esel- Anti- Kaninchen-Cy5, 1:300).
- Nach drei Waschschritten f
 ür je 5 min in PBS und ddH₂O, werden die Kryoschnitte auf Objektträgern mit Eindeckmedium eingedeckelt.

2.2.3 Auswertung der Netzhäute von ROP- Mäusen

Mit 50- facher Vergrößerung werden überlappende Einzelbilder der gefärbten Netzhäute abfotografiert und mit der "Photomerge"- Funktion von Photoshop CS3 zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Fokussiert wird dabei die "Lamina interna retinae", um die prelaminären Neovaskularisationen (Tufts) von dem darunter liegenden Netzwerk unterscheiden zu können. Dies stellt einen wichtigen Schritt dar, um die Neovaskularisationen in der folgenden Auswertung besser quantifizieren zu können. Die Bilder wurden nachträglich nicht manipuliert, weder Hintergrund noch Intensität und Farbkurven wurden bearbeitet. Die Quantifizierung orientiert sich an dem Paper von Connor *et al.* [313] und erfolgen mit der Bildbearbeitungssoftware Photoshop CS3. Zunächst wird mit der "Magic- Wand"- Funktion die gesamte Retina markiert und die Fläche mit dem "Measurement"- Werkzeug von Photoshop ausgemessen. Mit dem "polygonalem Lasso"- Werkzeug werden dann die Grenzen der Vaso-Obliteration abgefahren und damit die Bereiche des Gefäßunterganges markiert. Die Quantifizierung der Fläche erfolgt wieder mit der "Measurement"- Funktion. Nach derselben Methode werden die Tufts vermessen. Aufgrund der Fokussierung der "Lamina interna retinae" bei der Bildaufnahme, lassen sich die Neovaskularisationen, durch die höhere Intensität der Fluoreszenz, gut vom darunter liegenden Gefäßnetzwerk unterscheiden. Sie werden wie die Vaso-Obliterationen mit dem "polygonalem Lasso"- Werkzeug markiert und mit der "Measurement"- Funktion vermessen.

2.2.4 Auswertung der physiologischen Gefäßreifung

Als Indikator für die physiologische Gefäßreifung wird der Anteil des primitiven Gefäßplexus am Gefäßgesamtnetzwerk an Tag 12 vermessen. Zu diesem Zeitpunkt haben die Gefäße bereits die Peripherie erreicht. Zentral beginnen Differenzierungs- und Reifungsvorgänge der Gefäße. Am äußeren Rand kann am Tag 12 immer noch einen kleinen Bereich des primären Gefäßplexus erkennen. Dieser unterscheidet sich durch seine dicken, plumpen Gefäße vom reifen Netzwerk und beschränkt sich nur auf die Ganglienzellschicht. Der primäre Plexus lässt sich somit leicht mit dem "polygonalem Lasso"- Werkzeug markieren und vermessen.

Die Auswertung der Gefäßdichte bei ausgewachsenen Mäusen geschieht mittels eines konfokalen Mikroskops. Aus den vier Quadranten der retinalen Flatmounts wird je ein Bild der oberflächlichen, intermediären und tiefen Gefäßschicht geschossen. In Photoshop erfolgt die Umwandlung in Schwarz-Weiß Bilder und mit Invert Funktion stellen sich die Gefäße als schwarz da. Das Photoshop- Plugin Fovea Pro (Reeindeer Graphics) wandelt die Gefäße in 1 Pixel große Striche um und kann dann das Gefäßnetzwerk vermessen. Die Gefäßdichte errechnet sich als Länge des Gefäßnetzwerkes pro Quadratmillimeter.

2.2.5 Isolierung und intravitreale Injektion CD11b- positiver Zellen

Die Zellisolierung wird nach Ritter *et al.* [239] und dem MACS[™]- Protokoll der Firma Miltenyi Biotec GmbH durchgeführt.

- 1. Im ersten Schritt werden Oberschenkelknochen von UBI-GFP/BL6 transgenen Mäusen freipräpariert, die proximalen und distalen Enden der Femores mit dem Skalpell entfernt.
- Der so eröffnete Markraum wird mit kaltem, steril- filtrierten Zellisolierungspuffer mittels Spritze und 22Gauge-Nadel durchgespült, um die Zellen zu sammeln.
- Die Zellen je Femur werden in 12 ml Zellisolierungspuffer aufgenommen und die Zellsuspension durch einen "MACS[™] PRE-Separation" Filter gegossen.
- 4. Bei 4°C werden die Zellen in der Zentrifuge bei 1200 rpm abzentrifugiert.
- 5. Das Zellpellet wird in 450 µl Zellisolierungspuffer resuspendiert.
- 6. Zugabe von anti- CD11b Beads (75 μl/Femur) und Inkubation bei 4°C für 30 min.

- Nach Ablauf der 30 min werden die Zellen wieder abzentrifugiert und einmalig mit kaltem Zellisolierungspuffer gewaschen, abzentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml Zellisolierungspuffer resuspendiert.
- Die MACS[™] LS- S\u00e4ulen werden einmalig mit kaltem Zellisolierungspuffer gesp\u00fclt und im Anschluss mit der Zellsuspension beladen.
- 9. Dreimaliges Waschen der Säule mit je 3 ml Zellisolierungspuffer.
- 10. Die MACS[™]LS- Säulen werden vom Magneten genommen, auf ein 15 ml Falcon gesetzt und die Zellen mit 5 ml Zellisolierungspuffer eluiert.
- Anschließend erfolgen die Zellzählung und die Aliquotierung auf 500.000 Zellen CD11b- positiver Zellen pro μl Zellisolierungspuffer.

Intravitreale Injektion: Vorsichtig wird der noch geschlossene Augenlidspalt von prähypoxischen P5-6 Mäusejungen geöffnet, um den Augenbulbus freizulegen. Zuvor wurden die Mäusejungen mit Isofluran betäubt. In ein Auge werden 800.000 CD11b positive Zellen aus B6.WT in 2 μl Zellisolierungspuffer injiziert, in das kontralaterale Auge Zellen aus B6.*Ceacam1^{-/-}* - Mäusen. Als Kontrolle werden in einige Augen Zellisolierungspuffer ohne Zellen injiziert, oder gar keine Zellen, um den natürlichen Verlauf der Frühgeborenenretinopathie zu beobachten.

2.2.6 Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Die Anzahl lebender Zellen wurde mit dem Trypanausschlusstest bestimmt. Der Test beruht darauf, dass tote Zellen durch Änderung der Membrandurchlässigkeit Trypanblau aufnehmen, währenddessen lebende Zellen den Farbstoff aus dem Zellinneren ausschließen. Zellsuspensionen wurden mit Trypanblau 1:10 verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 100 µm) ausgezählt.

2.2.7 <u>Statistik</u>

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS 15.0, die Visualisierung mit GraphPad Prism 5.0. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden ungepaarte Student's t-tests durchgeführt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. In Kapitel 3.1 wird der Einfluss von CEACAM1 auf die physiologische Entwicklung der Netzhautgefäße beschrieben. Das nachfolgende Kapitel 3.2 beschäftigt sich damit, welche Folgen der Verlust von CEACAM1 auf die einzelnen Abschnitte der Frühgeborenenretinopathie (Vaso-Obliteration, Neovaskularisation und Revaskularisierung) bei der Maus hat. Das letzte Kapitel 3.3 zeigt, dass die CEACAM1- positiven Mikroglia mögliche Effektorzellen der Revaskularisierung sind und dass die Injektion von CD11b- positiven Vorläuferzellen eine zukünftige therapeutische Option sein könnte.

3.1 <u>Einfluss von CEACAM1 auf die physiologische Entwicklung der</u> <u>Netzhautgefäße</u>

Der erste Arbeitsschritt des Projektes bestand darin zu evaluieren, ob die physiologische Entwicklung der retinalen Gefäße durch das Fehlen von CEACAM1 beeinträchtigt ist, als Grundlage für die Interpretation nachfolgender Versuche. Dazu wurde das retinale Gefäßnetzwerk zwischen B6.WT- und B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen unter Normoxie immunhistologisch nach Isolectin B4- Färbungen analysiert. Gewählt wurden 7- und 12 Tage, sowie 12- Wochen alte Tiere, um alle Phasen der Gefäßentwicklung abzubilden.

Zur Beurteilung der Entwicklung des primären Gefäßplexus und der arterio-venösen Differenzierung des Plexus erfolgten Bestimmung der Gefäßdichte und Durchmesser von Arterien und Venen an Tag 7 postpartal (Abb. 3.1). In diesem Stadium der Gefäßentwicklung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden.

So betrug die Gefäßdichte 95.58 µm/mm² ±15.21 µm/mm² bei den B6.WT- Mäusen und 95.67 μ m/mm² ±6.94 μ m/mm² bei den B6.*Ceacam1^{-/-}*-Tieren (Abb. 3.1 A,B). Ebenso fanden sich keine Hinweise auf eine Störung der arterio-venösen Differenzierung des Gefäßplexus bei ähnlichen Gefäßdurchmessern zwischen den Genotypen (Abb. 3.1 C,D; Arteriendurchmesser: B6.*Ceacam1^{-/-}*-Mäusen; 5.87µm±0.91µm bei den B6.WTund 5.55µm±0.7µm Venendurchmesser: 10.01µm±1.01µm bei den B6.WT- und 9.70µm±1.46µm B6.Ceacam1^{-/-}-Mäusen, nicht signifikant). Als indirekter Marker der proliferativen Kapazität der retinalen Endothelzellen erfolgte zusätzlich eine Längenbestimmung der aussprießenden Tip-Zellen. Kongruent zu obigen Befunden zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien (Abb. 3.1 E,F; 31.30µm±5.88µm bei den B6.WT- und 30.60μm±5.22μm B6.*Ceacam1^{-/-}*-Mäusen, nicht signifikant, B6.WT: n=5, B6.*Ceacam1^{-/-}*: n=10, gilt auch für obige Analysen).



Abb. 3.1 <u>Primärer retinaler Gefäßplexus an Tag 7</u>: Es zeigten sich keine Unterschiede in der physiologischen Gefäßentwicklung zwischen den Genotypen an Tag 7. Retinale "Flat-Mounts" wurden mit Isolectin B4 (grün, B,D,F) gefärbt und die Gefäßdichte (A,B), der Durchmesser von Arterien und Venen (C,D), sowie die Länge der aussprießenden Tip-Zellen analysiert. Jedes Quadrat repräsentiert einen retinalen Flat-Mount (A), oder ein Gefäß (C,E). Abgebildet sind Mittelwerte ±SEM, Maßstabsbalken: 50µm in (B), 20µm in (D,F).

Zusätzlich erfolgte als Indikator für den Reifezustand der Gefäße eine Färbung der Perizyten mit dem Marker "Nerval/Glial antigen 2 (NG2)". Durch Bildung der Basalmembran stabilisieren Perizyten Gefäße, sodass ein mangelnder Perizytenbesatz zu einer erhöhten Vulnerabilität durch Hypoxie führen würde. An Tag 7 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 3.2).



Abb. 3.2 <u>Darstellung der Perizyten im primären retinalen Gefäßplexus am Tag 7</u>: Es zeigten sich keine Unterschiede im Perizytenbesatz zwischen den Genotypen (**B6.WT: A, B6.***Ceacam1*^{-/-}: **B**) am Tag 7. Retinale "Flat-Mounts" wurden mit Isolectin B4 (grün) und NG2 (rot) gefärbt. Maßstabsbalken: 25μ m in (B).

Es folgten Analysen der Gefäßreifung an 12 Tage alten Tieren, wobei sich auch hier keine Unterschiede zwischen den Mauslinien zeigten (Abb. 3.3). In diesem Stadium sollten die Gefäße größtenteils die Peripherie der Netzhaut erreicht haben, was auch für beide Genotypen zutraf. Es fanden sich keine retinalen Bereiche mit fehlender Vaskularisierung (Abb. 3.3. A,B). Durch Remodelingvorgänge am primären Gefäßplexus sollte sich an Tag 12 größtenteils ein mehrschichtiges, feines Gefäßnetzwerk gebildet haben. Störungen dieser Reifungsvorgänge würden in einem größeren Anteil an primärem Gefäßplexus resultieren. Die mikroskopische Beurteilung der mit Isolectin B4-FITC gefärbten Netzhäute erbrachte auch hier keinen Unterschied in der physiologischen retinalen Gefäßentwicklung zwischen B6.WT- und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen (Abb. 3.3). Bei beiden Mauslinien fanden die Reifungsvorgänge im gleichen Umfang statt. Bei den B6.WT bestanden nur noch 5.56% ± 0.59% Gefäßnetzwerkes aus primären oberflächlichen Plexus, bei den B6.*Ceacam1*^{-/-} 6.50% ± 0.76%, wobei dieser geringe Unterschied von 0.94% nicht signifikant war (Abb. 3.3 A-C).

Um spätere Störungen der Gefäßentwicklung auszuschließen, wurde zusätzlich die Gefäßdichte (Gefäßstrecke in Millimetern pro Quadratmillimeter) bei ausgewachsenen drei Monate alten Mäusen analysiert. Störungen können sich sowohl in einer Abnahme als auch in einer Zunahme der Gefäßdichte wiederspiegeln. Es wurde die Gefäßdichte für alle drei Gefäßschichten der Netzhaut von B6.WT- und B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte sowohl im oberflächlichen, intermediären und tiefen Gefäßplexus (Abb. 3.3. D-F). Das oberflächliche Netzwerk ergab bei B6.WT eine Dichte von 24.34 mm/mm² ± 1.65 mm/mm², bei B6.*Ceacam1^{-/-}* von 22.38 mm/mm² ± 1.96 mm/mm² (P=0,48; nicht signifikanter Unterschied). Die dichtere intermediäre Schicht hatte bei

den B6.WT eine Länge von 32.21 mm/mm² \pm 2.87mm/mm², bei den B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren von 32.07 mm/mm² \pm 2.01 mm/mm² (P=0,97; nicht signifikanter Unterschied). Auch die tiefe Gefäßschicht zeigte keine signifkanten Unterschiede zwischen B6.WT- und B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen (P=0,89). Sie ergab bei B6.WT eine Dichte von 40,62 mm/mm² \pm 2.99 mm/mm², bei B6.*Ceacam1^{-/-}* von 41.21 mm/mm² \pm 1.28 mm/mm².



Abb. 3.3 <u>Retinale Gefäße nach 12 Tagen (A-C) und 12 Wochen (D-F):</u> Verlust von CEACAM1 bei B6.*Ceacam1^{-/-}*-Mäusen führt zu keiner Verzögerung der physiologischen, retinalen Gefäßentwicklung. Die Netzhautgefäße von zwölf Tage alten, unbehandelten B6.WT- (A) und B6.*Ceacam1^{-/-}*-(**B**) Mäusen wurde mit Isolectin B4-CY3 gefärbt (rot). Bei beiden Mauslinien ist die gesamte Retina von Gefäßen bedeckt (**A**,**B**). Die Reste des primären, oberflächlichen Gefäßplexus wurden mit Photoshop hervorgehoben (gelb) und die Fläche ausgemessen). In (**C**) sind die gemessen Flächen des primären Plexus von B6.WT- und B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen gegenübergestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM, Maßstabsbalken 1mm; P12-B6.WT, n=12 ; P12-B6.*Ceacam1^{-/-}*, n=11.

(D-F) Bei ausgewachsenen *Ceacam1*- defizienten Mäusen findet sich im Vergleich zum B6.WT keine Änderung im ausgereiften Gefäßnetzwerk **(D-F)**. Die Netzhautgefäße von drei Monate alten, unbehandelten, B6.WT- **(D,E)** und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen wurden mit Isolectin B4-FITC gefärbt. Mit einem konfokalem Mikroskop wurde die einzelnen Gefäßschichten abfotografiert und die Gefäßdichte der einzelnen Schichten mit Photoshop ausgemessen (Methode, siehe 2.3) und in **(F)** gegenübergestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM, Maßstabsbalken 20µm; B6.WT, n=5; B6.*Ceacam1*^{-/-}, n=5; nicht signifikant(n.s.).

3.2 Einfluss von CEACAM1 auf die Frühgeborenenretinopathie der Maus

Im nächsten Schritt wurde immunhistochemisch nachgewiesen, dass die Gefäße der Netzhaut CEACAM1 exprimieren. Vor allem die Neovaskularisationen, die während der ROP entstehen und in den Glaskörper hineinragen, zeigten eine starke Expression von CEACAM1, während ältere und größere Gefäße CEACAM1 nur schwach exprimierten (Abb. 3.4).



Abb. 3.4 <u>CEACAM1-</u> <u>Expression in der Netzhaut</u>: Die neu gebildeten Gefäße während der Frühgeborenenretinopathie exprimieren CEACAM1. Abgebildet sind immunistochemische Färbungen von Paraffinschnitten aus 17 Tagen alten B6.WT (**A**,**C**) und B6.*Ceacam1^{-/-}* Mäusen (**B**). (Bild (A), Färbung nach APAAP-Methode mit ungelabelten CEACAM1- Primärantikörper, CEACAM1 stellt sich dunkelrot dar; Bild (C), Färbung mit direkt gelabelten CEACAM1-FITC- Antikörper (grün), Gefäße wurden mit Isolectin B4-Cy gefärbt (rot), DAPI (blau); als Negativkontrolle wurden Schnitte von B6.*Ceacam1^{-/-}* Netzhäuten gefärbt. Diese Tufts sind negativ für CEACAM1 (B). Maßstabsbalken 20μm.

3.2.1 Einfluss von CEACAM1 auf die Vaso-Obliteration in Phase 1 der ROP

Während es viele Daten über die Regulation der Angiogenese und Gefäßdifferenzierung durch CEACAM1- Expression in verschiedenen Tumor-, Wundheilungs- und Atherosklerosemodellen gibt, wurde bisher nicht der Einfluss von CEACAM1 auf Endothelzellen unter Hyperoxie untersucht, die in der ersten Phase des ROP-Modells zu einem Untergang zentral gelegener Anteile des Gefäßnetzwerkes führt. Diese Vaso-Obliteration, sowie Gefäßremodeling und Neovaskularisationen wurden an den Zeitpunkten P8, P12, P17 und P19 zwischen den Genotypen analysiert. Bereits 24h Hyperoxie führten in den B6.*Ceacam1*^{-/-}- Mäusen zu einem leicht erhöhtem, aber signifikanten Gefäßuntergang verglichen mit den B6.WT- Tieren (Abb. 3.5). So waren bei den B6.WT- Tieren (Abb. 3.5 A,C; n=6) 30.01% \pm 1.01% der vorhanden Gefäße obliteriert, bei den B6.*Ceacam1*^{-/-}- Mäusen (n=6) hingegen 32.83% \pm 0.7165% (Abb. 3.5 B,C; P=0.047).









Abb. 3.5 <u>Vaso-Obliteration nach 24h Hyperoxie:</u> Bei den B6.*Ceacam1^{-/-}* (**B**,**C**) obliterieren nach 24h bereits mehr Gefäße als bei den B6.WT - Tieren (A,C). Abgebildet sind die Netzhäute von acht Tage alten Mäusen nach 24h Hyperoxie. Die Gefäße wurden mit Isolectin B4- FITC (grün) dargestellt. Die Vaso-Obliteration wurden mit Photoshop hervorgehoben (gelb) (A/B), quantifiziert und sind in (C) gegenübergestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM; Maßstabsbalken, 1mm).

Die erhöhte Empfindlichkeit CEACAM1- negativer Gefäße gegenüber Hyperoxie bedingter Schädigung setzte sich auch in nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten fort.

An Tag 12, nach 5 Tagen Hyperoxie, zeigten B6.*Ceacam1*^{-/-}- Mäusen signifikant größeren Gefäßuntergang als die B6.WT (P<0.0001) Tiere (Abb. 3.6). Bei den B6.*Ceacam1*^{-/-}- Tieren (n=15) wurden durchschnittlich 31.56% \pm 1.48% der vorhandenen Gefäße abgebaut, bei den B6.WT- Tieren (n=11) nur 22.10% \pm 1.38%.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Gefäßreifung bei den B6.WT- Mäusen während der fünftägigen Hyperoxie signifikant schneller voranschritt als bei den CEACAM1- negativen Tieren, bei denen es zu einem Arrest der Gefäßweiterentwicklung zu kommen schien (Abb. 3.7). Nach 5 Tagen Hyperoxie hatte der primäre Gefäßplexus bei den B6.WT nur einen Anteil von 6.72% ± 1.0% am Gesamtgefäßnetzwerk. Das ist ein ähnlicher Wert wie bei den B6.WT, die keinem Sauerstoff ausgesetzt waren (Abb. 3.3 A-C, unbehandelte B6.WT, 5.56% ± 0.60%, n=12). Bei den B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen fand sich mit 16.18% ± 1.25% ein signifikant größerer Anteil an unreifem Gefäßnetzwerk als bei den B6.WT- und B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren (Abb. 3.3 A-C, unbehandelte B6.*Ceacam1^{-/-}*, 6.50% ± 0.76%, n=11; P<0,0001).

Vaso-Obliteration P12



Abb. 3.6 <u>Vaso-Obliteration P12:</u> Bei den B6.*Ceacam1*^{-/-} (**C/D**) obliterieren mehr Gefäße als bei den B6.WT (**A/B**). Abgebildet sind die Netzhäute von zwölf Tage alten Mäusen nach Hyperoxie. Die Gefäße wurden mit Isolectin B4-FITC (grün) dargestellt. Die Vaso- Obliteration wurde mit Photoshop hervorgehoben (**gelb**) (**B/D**), quantifiziert und sind in (**E**) gegenübergestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM, Maßstabsbalken, 1 mm.



Abb. 3.7 <u>Gefäßreife nach fünf Tagen Hyperoxie:</u> Bei B6.*Ceacam1^{-/-}* - Mäusen kommt es während der Hyperoxie zu einem Arrest der Gefäßreifung. Bei den B6.*Ceacam1^{-/-}* finden sich mehr unreife Gefäße als bei den B6.WT. Abgebildet sind die Netzhäute von zwölf Tage alten B6.WT (**A/B**)und B6.*Ceacam1^{-/-}* - Mäusen (**C/D**). Die Gefäße wurden mit Isolectin B4- FITC gefärbt (grün). Das unreife, oberflächliche Netzwerk (primärer, eindimensionaler Gefäßplexus) wurde mit Photoshop markiert (**gelb**) (**A/B**) und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in (**E**) gegenübergestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM, Maßstabsbalken, 1 mm.

3.2.2 <u>Einfluss von CEACAM1 auf die Neovaskularisation und</u>

Revaskularisation in Phase 2 und 3 der ROP

Für die Analyse der proliferativen Phasen der ROP wurden Tag 17 und 19 ausgewählt. Am Tag 17 finden sich die meisten Neovaskularisationen. Nach Tag 17 nehmen Neovaskularisation ab, weswegen man besonders an Tag 19 das Ausmaß Revaskularisierung beurteilen kann.

Am Tag 17 nehmen die avaskulären Bereiche 12.48% \pm 1.04% der Netzhaut bei den B6.WT (n=8) und 18.37% \pm 0.775% bei den B6.*Ceacam1*^{-/-}- Tieren (n=14) ein. Wie an Tag 12 ist dieser Unterschied der Vaso-Obliteration signifikant (P<0,0001). Ähnliches gilt für die Neovaskularisationen. Die "Tuft- Formationen" nehmen bei den B6.WT 3.26% \pm 0.44% der Netzhaut, bei den B6.*Ceacam1*^{-/-} 5.86% \pm 0.30% ein (P<0,0001).

Diesen Unterschied holen die B6. *Ceacam1^{-/-}*- Tiere bis Tag 19 nicht mehr auf. Es findet sich erneut ein signifikanter Unterschied bei Vaso-Obliteration und Neovaskularisationen (P<0,0001) bei den beiden Mauslinien. Bei den B6.WT (n=11) sind noch 6.58% \pm 0.70% der Gefäße obliteriert, bei den B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren (n=14) 15.97% \pm 1.02%. In den Glaskörper hineinragende Gefäße machen bei den B6.WT noch 1.98% \pm 0.28%, bei den und B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren noch 5.10% \pm 0.42% aus.

Um zu klären, ob sich die Unterschiede in der Vaso-Obliteration an den Tagen 17 und 19 durch den großen Unterschied an Tag 12 erklären lassen, oder ob zusätzlich die Revaskularisierung beeinträchtigt ist, wurde berechnet, wie schnell die avaskulären Bereiche vaskularisiert wurden. Bei den zwölf Tage alten B6.WT waren im Durchschnitt 73,68% der Netzhaut von Gefäßen bedeckt. Bis Tag 19 nahm der vaskularisierte Bereich um 19,73% zu. Bei den B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren wurden im selben Zeitraum nur 15,59% der obliterierten Bereiche wieder mit Gefäßen versorgt, was auf eine Verzögerung der Revaskularisierung schließen lässt. Zusätzlich scheint der Abbau der Tufts verzögert zu sein. Bei den B6.WT werden von Tag 17 bis 19 1,28%, bei den B6. *Ceacam1^{-/-}*- Tieren nur 0,76% der Tufts abgebaut.

Verzögerte Revaskularisierung lässt sich durch eine Fehlfunktion beim Aussprießen aus bestehenden Gefäßen erklären. Um zu klären, ob dies bei den B6.*Ceacam1^{-/-}* der Fall ist, wurden die Tip- Zellen histologisch untersucht. Dabei fand sich mit 15.65 μ m ± 1.14 μ m bei den B6.WT und 16.06 μ m ± 1.67 μ m bei B6.*Ceacam1^{-/-}*- Tieren kein Unterschied in der Länge der Tip- Zellen. Allerdings zeigen sich bei den B6.*Ceacam1^{-/-}*-Tieren häufiger rarefizierte Tip- Zellen, ohne die charakteristischen, langen "Fäden".



Abb. 3.8 <u>Verlust von CEACAM1 in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen führt zu einer Zunahme von Vaso-Obliterationen und <u>Neovaskularisation am Tag 17</u>: Netzhäute von B6.Wt- (n=8) (a,c) und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen (n=16) (b,d) wurden am Tag 17, nach fünf Tagen Hyperoxie zwischen P7 und P12, untersucht. Die Netzhautgefäße wurden mit Isolectin-B4- FITC (grün) gefärbt. Zur Quantifizierung wurden Vaso-Obliteration (gelb) und Neovaskularisation (rot) mit Photoshop CS3 hervorgehoben (c,d) und vermessen. Vaso-Obliteration (e) und Neovaskularisationen (f) von B6.WT- und B6. *Ceacam1*^{-/-} Mäusen wurden miteinander verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM. *** P<0,001 (Maßstabsbalken, 1 mm).</u>



Abb. 3.9 <u>Verlust von CEACAM1 in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen führt zu einer Zunahme von Vaso-Obliterationen und Neovaskularisation am Tag 19</u>: Netzhäute von B6.Wt- (n=11) (a,c) und B6.*Ceacam1*^{-/-}-Mäusen (n=14) (b,d) wurden am Tag 19, nach fünf Tagen Hyperoxie zwischen P7 und P12, untersucht. Die Netzhautgefäße wurden mit Isolectin-B4- FITC (grün) gefärbt. Zur Quantifizierung wurden Vaso-Obliteration (gelb) und Neovaskularisation (rot) mit Photoshop CS3 hervorgehoben (c,d) und vermessen. Vaso-Obliteration (e) und Neovaskularisationen (f) von B6.WT- und B6. *Ceacam1*^{-/-} Tieren wurden miteinander verglichen. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM, *** P<0,001, Maßstabsbalken, 1 mm.



Abb. 3.10 <u>Verlust von CEACAM1 in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen führt zu einer Verzögerung der Revaskularisation und <u>verlangsamten Abbau von Neovaskularisationen</u>: (A/B) zeigen die Zunahme der vaskularisierten, retinalen Bereiche von Tag 12 bis Tag 19 für B6.WT (karierte Säulen) und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse (schraffierte Säulen). Innerhalb dieser sieben Tage werden bei den B6.WT 19,7%, bei den B6.*Ceacam1*^{-/-} Tieren nur 15,6% der obliterierten Bereiche revaskularisiert (B). Zugleich werden von Tag 17-19 bei den B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäuse nur 0,76% der Neovaskularisationen abgebaut, bei den B6.WT 1,27% (C/D). Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM.</u>



Abb. 3.11 <u>Die Tip- Zellen in B6.*Ceacam1*^{-/-} **Mäusen**</u>: Während sich kein Unterschied in der Länge der Tip- Zellen zwischen B6.WT- (n=50) (A/C) und B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen (n=50) (B/C) zeigt, finden bei den B6. *Ceacam1*^{-/-} Tieren rarefizierte Tip- Zellen, jedoch ohne signifikanten Unterschied der Länge der fädenartigen Fortsätze (C). Die Tip-Zellen wurden mittels Isolectin-B4-FITC (grün gefärbt). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM, Maßstabsbalken 5µm.

3.3 Aktivierungszustand von Mikroglia während der ROP

Neben Endothelzellen sind Mikroglia die einzigen residenten Zellen des ZNS, die CEACAM1 exprimieren. Dies, und die Tatsache, dass Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der ROP spielen [314], führten zur histologischen Untersuchung dieser Zellen. Es zeigte sich, dass Mikroglia in B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen ramifizierter sind als in den Kontrolltieren, was für eine verminderte Aktivierung dieser Zellen spricht. Um das zu bestätigen, wurden die Zellen mit Iba1 gefärbt. Iba1 ist ein intrazelluläres Protein und wird bei der Aktivierung von Mikroglia hochreguliert. Iba1 greift über die Organisation des Zytoskeletts in Migrations- und Phagozytosevorgänge dieser Zellen ein [315, 316]. Fehlen von Iba1 führt dabei *in vitro* zu verminderter Phagozytose und Plastizität der Zellen [315, 316]. Mikroglia aus B6.*Ceacam1^{-/-}*-

Mäusen zeigen eine geringere Expression von Iba1. Allerdings muss man diese Ergebnisse mit der Einschränkung beobachten, dass nicht Einzelzellen sondern die gesamte, 100 µm dicke Retina gefärbt wurde.



Abb. 3.12 <u>Verlust von CEACAM1 in B6.Ceacam1^{-/-} Mäusen führt zu verminderter Aktivierung von Mikroglia-Zellen</u>: Netzhäute von B6.Wt- (a,c,e) und B6.Ceacam1^{-/-}-Mäusen (b,d,f) wurden am Tag 17, nach fünf Tagen Hyperoxie zwischen P7 und P12, untersucht. Mikroglia aus *B6.Ceacam1^{-/-}*-Mäusen zeigen eine ramifizierte, ruhende Morphologie (b,d) mit geringer Iba1- Expression (e), Mikroglia aus B6.WT eine amöboide, aktivierte Morphologie (a,c) mit höherer Iba1- Expression. Die retinalen Mikroglia wurden mit Isolectin- B4- FITC (grün) (a-d) und Iba1 (rot) (e,f) dargestellt.

3.4 <u>Intravitreale Injektion von CD11b- positiven Knochenmarkzellen</u> (BMDCs)

Morphologie und Iba1- Expression lassen vermuten, dass CEACAM1 Mikroglia reguliert und aktiviert. Während der Frühgeborenenretinopathie werden CD11b⁺-Knochenmarkszellen (CD11b⁺- BMDCs) in die ischämischen Areale rekrutiert [314, 317]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen zu Mikroglia differenzieren und die Wiederherstellung des Gefäßnetzwerkes nach ROP beschleunigen [188, 239, 314, 318]. Da CD11b⁺- Zellen CEACAM1 exprimieren wurde überprüft, ob die Funktion dieser Zellen beeinträchtigt ist und so das unterschiedliche Revaskularisierungsverhalten der beiden Mauslinien erklärt werden kann. Um die physiologische Rekrutierung von CD11b⁺- BMDCs aus dem Knochenmark zu simulieren, wurden diese Zellen aus Femores von UBI-GFP/B6.WT- und UBI-GFP/ B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen isoliert und intraokulär appliziert. CD11b⁺- BMDCs aus den Kontrolltieren integrieren in die Netzhaut und differenzieren dort zu Mikroglia, sammeln sich gehäuft in ischämischen Gebieten und assoziieren mit dem sich entwickelten Gefäßnetzwerk. Bei CD11b⁺- BMDCs aus B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen konnte in fünf unabhängigen Versuchen keiner dieser Prozesse beobachtet werden. Stattdessen bleiben die Zellen auf der inneren retinalen Grenzmembran liegen und gehen zugrunde (siehe Abb. 3.13, Abb. 3., Abb. 3.15).

Leider konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, ob sich dieses unterschiedliche Verhalten der CD11b⁺- BMDCs letztendlich auf die Revaskularisierung auswirkt. Durch die kleine Verletzung bei Injektion der Zellen werden so viele angiostatische Faktoren ausgeschüttet, dass nicht beurteilt werden kann, ob CD11b⁺- BMDCs oder die Injektion selbst zur Revaskularisierung beitragen (siehe Abb. 3.16).

Doch auch wenn der Nachweis noch nicht erbracht wurde, dass CEACAM1⁺-CD11b⁺- BMDCs aus den Kontrolltieren die Reparaturvorgänge der Gefäße im Vergleich zu den B6.*Ceacam1^{-/-}*-Mäusen beschleunigen, ist aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens dieser Zellen nach intraokulärer Injektion davon auszugehen, dass CEACAM1 für eine geordnete Funktion dieser Zellen notwendig ist.



Abb. 3.13 <u>Verlust von CEACAM1 in B6.*Ceacam1*^{-/-} Mäusen führt zu verminderter Rekrutierung von CD11b⁺-</u> <u>BMDCs in ischämische Areale nach intravitrealer Injektion dieser Zellen</u>: Netzhäute von B6.Wt- (a,c,e) und B6.*Ceacam1*^{-/-}-Mäusen (b,d,f) wurden am Tag 17, nach intravitrealer Injektion von CD11b+- BMDCs am Tag 6, untersucht. Die Netzhäute wurden mit Isolectin-Cy3 (a,b) und Iba1 (c,d) gefärbt. Die transplantierten Zellen exprimieren GFP (e,f). (a,c,e) zeigen, dass CD11b⁺- BMDCs aus Kontrolltieren sich in Bereichen der Vaso-Obliteration sammeln (e) und verstärkt Iba1 exprimieren (c). All diese Beobachtungen finden sich nicht bei den B6.*Ceacam1*^{-/-}-Mäusen.



Abb. 3.14 <u>Verlust von CEACAM1 in CD11b⁺- BMDCs aus B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen führt zu einem verminderten <u>Migrations-, Invasions- und Differenzierungspotential dieser Zellen</u>: Netzhäute von B6.Wt- (a,c,e) und B6.*Ceacam1^{-/-}*-Mäusen (b,d,f) wurden am Tag 17, nach intravitrealer Injektion von CD11b⁺- BMDCs am Tag 6, untersucht. Die Netzhäute wurden mit Isolectin-Cy3 (a,b) und Iba1 (c,d) gefärbt. Die transplantierten Zellen exprimieren GFP (e,f). (a,c,e) zeigen, dass CD11b⁺- BMDCs aus Kontrolltieren sich in die Netzhaut integrieren und zu Iba1- exprimierenden Mikroglia werden (c,e). CD11b⁺- BMDCs aus B6.*Ceacam1^{-/-}*- Mäusen hingegen bleiben auf der inneren, retinalen Grenzmembran liegen und gehen zugrunde (b,d,f).</u>



Abb. 3.15 <u>CD11b⁺- BMDCs aus B6.WT- Mäusen adhärieren an sich entwickelnde Gefäße und vermitteln so</u> <u>eventuell das angiogene Potential von CEACAM1</u>: Netzhäute von B6.Wt- (a-d) wurden am Tag 17, nach intravitrealer Injektion von CD11b⁺- BMDCs am Tag 6, untersucht. Die Netzhäute wurden mit Isolectin-Cy3 und Iba1-Cy5 (Isolectin Cy3: rot; Iba1-Cy5:gelb) gefärbt. Die transplantierten Zellen exprimieren GFP (grün). Transplantierte, GFP-, Iba1- und Isolectin- positive, zu Mikroglia differenzierte CD11b⁺- BMDCs sind blau (Overlay) abgebildet, Gefäße rot. Es zeigte sich eine enge Verbindung dieser Zellen zu den Gefäßen (a,b). Teilweise überbrücken sie sogar aufeinander zuwachsende Tip- Zellen (c,d), und ermöglichen so die Revaskularisierung.



Abb. 3.16 <u>Die intravitreale Injektion hat einen großen Einfluss auf die Gefäßentwicklung während der ROP</u>: Netzhäute von B6.WT- (a,b) wurden am Tag 17, nach intravitrealer Injektion von PBS am Tag 6, untersucht. Die Netzhäute wurden mit Isolectin-Cy3 (a,b) gefärbt. Obwohl in beide Augen PBS injiziert wurde ist die linke Retina (a)</u> vollkommen vaskularisiert, die rechte (b) hingegen kaum. Anzahl der Injektionsversuche und Größe der Verletzung führen zu einem Ausschütten von angiostatischen Faktoren. Die Effekte der CD11b⁺- BMDCs werden so verschleiert.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Folgende Ergebnisse lassen sich zusammenfassen:

- 1. CEACAM1- defiziente Mäuse zeigten eine ungestörte physiologische Entwicklung des retinalen Gefäßnetzwerkes.
- Retinale Gefäße und retinale Neovaskularisationen exprimierten CEACAM1 in der Maus
- 3. Der Verlust von CEACAM1 führte zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff- induzierten Schäden mit vermehrten Vaso-Obliterationen und verminderter Gefäßreifung und Gefäßdifferenzierung in der hyperoxischen Phase der ROP. Bereits 24h nach Hyperoxie fanden sich geringe, signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen, weitere 5 Tage Hyperoxie führten zu einer Zunahme der Vaso-Obliterationen zu Ungunsten der CEACAM1- defizienten Mäuse.
- 4. Die Vaso-Obliterationen persistierten in den CEACAM1- defizienten Mäusen länger mit Zunahme der pathologischen retinalen Neovaskularisationen.
- 5. Zusätzlich zeigte sich eine effizientere Revaskularisation und schnellerer Abbau der Neovaskularisationen in den Wildtyp Mäusen, wobei CEACAM1- positive Mikroglia mögliche Effektorzellen der Revaskularisierung sind. Transplantationen dieser Zellen in die Netzhaut konnten diesen Effekt jedoch aufgrund hoher Variabilität nicht bestätigen.
- 6. Es zeigte sich keine quantitative Beeinträchtigung der Tip- Zellen.

4 **Diskussion**

Unkontrolliertes überschießendes Wachstum von Blutgefäßen ist die häufigste Ursache für Neuerblindungen in den Industrieländern. Bisherige Therapien gegen vasoproliferative Retinopathien beinhalten Laser-Koagulation der Neovaskularisationen und die Applikation von Antikörpern gegen VEGF. Regelmäßige Anwendungen dieser Therapien im 2-11 Wochenrhythmus sind notwendig für einen stabilen Therapieeffekt [319, 320], können aber durch Nebenwirkungen, wie lokalen Entzündungsreaktionen und Fibroblastenproliferation, die Grunderkrankung verschlechtern [320]. Da VEGF- Antikörper zudem die extrazelluläre Matrix nicht zerstören, bleiben "Gefäßschablonen" (Schläuche aus extrazellulärer Matrix, vorwiegend Kollagen) während dieser Therapien bestehen, die nach Absetzen eine nicht gewollte Revaskularisation schnell ermöglichen [321]. Neue und weitere supportive Therapien gegen proliferative Netzhauterkrankungen wären deshalb wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 auf die Frühgeborenenretinopathie (ROP) bei der Maus untersucht und als mögliches neues therapeutisches Target diskutiert. Die ROP steht dabei beispielhaft für viele vasoproliferative Augenkrankheiten. Bei der ROP kommt es zunächst durch Hyperoxie zum Gefäßuntergang und zweiten Schritt durch relative Hypoxie zu Neovaskularisationen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Phasen der Frühgeborenretinopathie erläutert und mögliche Wirkmechanismen von CEACAM1, welche die unterschiedlichen Krankheitsverläufe zwischen B6.WT- und *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen erklären können, diskutiert.

4.1 <u>CEACAM1 hat keine Einfluss auf die physiologische Gefäßentwicklung</u> <u>der Netzhaut</u>

Trotz der Beobachtungen, dass CEACAM1 alle Stadien der Angiogenese, von Proliferation über Migration von Endothelzellen bis hin zur Lumenbildung, *in vitro* auslöst, zeigen gesunde CEACAM1-defiziente Mäuse keine vaskulären Auffälligkeiten [298, 322]. Auch in den Versuchen dieser Arbeit zeigt sich keine Störung der physiologischen Gefäßentwicklung in der Netzhaut. Sowohl während der Entwicklung als auch im ausgereiften retinalen Gefäßnetzwerk finden sich keine Unterschiede zwischen B6.WT und *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen. Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen Befund ist, dass der Verlust von CEACAM1 durch Moleküle mit ähnlicher Struktur kompensiert wird. Ein möglicher Kandidat für dieses Molekül- Mimikry ist PECAM1
(CD31). Ähnlich wie CEACAM1 besitzt PECAM1 zytoplasmatische phosphorylierbare ITIM-Domänen, rekrutiert SHP-2 [323, 324] und führt zur Proliferation von Endothelzellen [325]. Während so die physiologische Gefäßentwicklung bei CEACAM1- defizienten Mäusen unbeeinträchtigt ist, kann der Verlust CEACAM1 bei hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen, wie sie bei der ROP vorherrschen, nicht mehr kompensiert werden. Erst unter diesen Bedingungen zeigen die CEACAM1- defizienten Mäusen einen Phänotypen, der im Folgendem näher erläutert wird.

4.2 <u>CEACAM1 schützt vor oxidativem Stress</u>

Viele Organismen haben ein zwiegespaltenes Verhältnis zu Sauerstoff. Ohne ihn wäre ein Leben nicht möglich, andererseits ist Sauerstoff giftig. Sauerstofftoxikosen, Vergiftungen mit Sauerstoff, sind lebensbedrohlich. Schädigungen der Lunge (Lorrain-Smith-Effekt) und zentralnervöse Symptome (Paul-Bert-Effekt) mit Krampfanfällen sind die Folge. Dies hat dazu geführt, dass hyperbare Beatmungen mit reinem Sauerstoff wesentlich restriktiver eingesetzt werden als noch vor einigen Jahrzehnten. Verantwortlich für Schäden sind, unter anderem, reaktive Sauerstoffspezies, die als Nebenprodukte bei einigen Stoffwechselvorgängen, z.B. der Atmungskette, gebildet werden. Bei einigen Krankheitsbildern lässt sich aber Beatmung mit hohen Sauerstoffpartialdrücken nicht vermeiden, ein Beispiel dafür sind Frühgeborene mit unreifen Lungen. Beatmung mit 100% Sauerstoff führt zu einem Anstieg des gelösten Sauerstoffs von 0,3 ml auf 1,8 ml O₂ /100 ml Blut. Der nicht an Hämoglobin gebundene Sauerstoff kann so in Bereiche vordringen, die für Blutzellen nicht zugänglich sind, unter anderem in nicht vaskularisierte Netzhautareale von Frühgeborenen mit anschließendem Untergang von Gefäßen. Ursachen für die Vaso-Obliteration sind abnehmende Spiegel von VEGF, welche aber essentiell für die Angiogenese und das Endothelzellüberleben sind. Zusätzlich führen freie Sauerstoffradikale durch oxidative Schädigung zu Apoptose, sowie durch Desorganisation des Zytoskeletts zu verringerter Endothelzellmigration und Zellzyklusarrest mit der Folge verminderter Zellproliferation [326].

Diese Arbeit konnte zeigen, dass CEACAM1 bereits frühzeitig im Krankheitsverlauf der ROP Sauerstoff-induzierten Gefäßuntergang verringert, das Gefäßnetzwerk stabilisiert und vor oxidativem Stress zu schützen scheint. Interessanterweise reagieren Zellen auf Hyperoxie mit der Heraufregulation von CEACAM1 [327]. Durch diese vermehrte Präsentation von homophilen CEACAM1- Bindungspartnern, werden eventuell die durch CEACAM1 vermittelten Prozesse potenziert und die schädlichen Einflüsse von Sauerstoff auf die Gefäße abgeschwächt. Vor allem die CEACAM1- Isoform mit dem langen zytoplasmatischen Anteil ist in der Lage die Aktivierung des Enzyms "endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase" (eNOS) zu reduzieren. Dieses Enzym produziert als reaktive Sauerstoffspezies Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxide. Beauchemin *et al.* konnten in B6.*Ceacam1*^{-/-}- Tieren erhöhte eNOS- Aktivität und damit schädigende NO- und Superoxidspiegel beschreiben [328]. Überexpression von eNOS in der Frühgeborenenretinopathie führt zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes und Zunahme der Vaso- Obliterationen [329]. Vermutlich führt daher die erhöhte eNOS Aktivität in den CEACAM1- defizienten Mäusen zu einer erhöhten Suszeptibilität der Gefäße gegenüber Hyperoxie mit vermehrten Zelluntergang und Vaso- Obliterationen im Rahmen der ROP.

Neben diesem Mechanismus konnten Kilic *et al.* in HDMEC- Zellen zeigen, dass CEACAM1 auf Endothelzellen als autokriner Wachstumsfaktor wirkt [330]. CEACAM1 führt in Endothelzellen zur Ausbildung eines angiogenen Phänotyps, wie z.B. der Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen *in vitro*. Gefäßwachstumsfördernde Substanzen wie VEGF, VEGFR2, IL8, Angiopoietin2 und Tie2 werden hoch-, angiostatische Substanzen herunterreguliert. Insbesondere VEGF und Interleukin-8 führen so, über Hochregulierung von Bcl-2, zum verlängerten Überleben von Endothelzellen [101]. Die Annahme, dass CEACAM1 zu einem autokrinen "VEGF- Loop" führt [330] und deswegen während der Hyperoxie in den *Ceacam1*^{-/-}-Tieren geringere Spiegel an Wachstumsfaktoren herrschen, könnte erklären, warum es bei den *Ceacam1*^{-/-}- Tieren zum Arrest der Gefäßentwicklung kommt. Geringere Konzentration an VEGF bedeutet, dass der primäre Gefäßplexus durch Hyperoxie nicht reifen und sich so kein dreidimensionales Netzwerk ausbilden kann, während das bei den B6.WT Mäusen der Fall ist.

Eine weitere Erklärung für den Wirkmechanismus liefert die Beobachtung, dass vor allem das unreife Kapillarbett von Vaso-Obliterationen betroffen ist, größere ruhende Arteriolen und Venolen hingegen nicht. Dieser Ruhe- bzw. Reifezustand von Gefäßen zeichnet sich neben Einstellung der Proliferation und Zunahme der Dichtigkeit durch Bildung einer Basalmembran und Rekrutierung von Perizyten aus. Diese muralen Zellen sind von großer Bedeutung für die retinale Gefäßentwicklung, denn hier ist die Dichte der Perizyten am höchsten [331]. Der Besatz der Gefäße mit Perizyten findet zeitversetzt statt. Am Tag 2 p.p. sind nur die großen Arteriolen von Perizyten bedeckt und erst nach drei Wochen p.p. ist der Perizytenbesatz des Gefäßnetzwerkes komplett. Funktion dieser zeitverzögerten Rekrutierung ist die Eröffnung eines "Plastizitäts- Fensters", in dem Angiogenese- und Remodelingvorgänge stattfinden und

sich so das dreidimensionale retinale Gefäßnetzwerk entwickelt. Der endgültige Perizytenbesatz nach drei Wochen stabilisiert das Netzwerk und weitere Umbauvorgänge sind nicht mehr möglich [201]. Geringere Anzahl oder Abnahme von Perizyten führen so, über Wiedereröffnung oder Verlängerungen dieses "Plastizitäts- Fensters", zur strukturellen Destabilisierung des Endothels. Verlust der Perizyten nach der vollständigen Entwicklung der Gefäße ist daher pathologisch und das erste Zeichen der diabetischen Retinopathie [332]. Dieser "Perizyten- Drop- Out" äußert sich, genau wie bei der Frühgeborenenretinopathie, im Verschluss von Kapillaren, Bildung von Mikroaneurysmen und retinalen Blutungen [333]. Mittlerweile konnte für die Frühgeborenenretinopathie gezeigt werden, dass Abnahme des Verhältnisses Perizyten- Endothelzellen mit Destabilisierung des Gefäßnetzwerkes, vermehrtem Gefäßuntergang und Neovaskularisationen verbunden ist [201, 334]. Ursachen sind möglicherweise, dass sich durch Verlust der Perizyten der Phänotyp bzw. die Funktion der Endothelzellen ändert. So inhibieren Perizyten durch TGF β endotheliale Proliferation [335], weniger Perizyten führen daher zu vermehrten Neovaskularisationen während der Frühgeborenenretinopathie [336]. Glukoseaufnahme in der Netzhaut ist Insulin- unabhängig. Aus diesem Grund akkumuliert Glukose beim Diabetes mellitus unaufhaltsam in der Retina. In den Perizyten führt dies dazu, dass der Zucker in Sorbitol umgewandelt wird. Bei diesen Stoffwechselvorgängen wird NADPH verbraucht, das die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies schützt. Die Kombination aus Sorbitol, das durch Osmose zum Platzen der Zellen führt, und reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), führen zum Tod der Perizyten beim Diabetes mellitus [337]. Daher ist es naheliegend, dass auch die anfallenden ROS während der hyperoxischen Phase der Frühgeborenenretinopathie zum Tod von Perizyten führen, was Hughes et al. durch Abnahme Desmin-positiver Zellen während der Hyperoxie nachweisen konnten [336]. Zusammenfassend ist in wenigen Organen die Intaktheit der Perizyten-Endothel-Interaktion so wichtig wie in der Netzhaut [338]. Bei der Frühgeborenenretinopathie tragen mangelnder Perizytenbesatz der unreifen Gefäße und erhöhter Perizytenuntergang zur Pathogenese dieses Krankheitsbildes bei. Interessanterweise konnten Sawa et al. durch Untersuchung am sich entwickelnden Rattenhirnen zeigen, dass CEACAM1 vor allen an den Kontaktstellen von Perizyten und Endothelzellen lokalisiert ist [339]. Es ist daher anzunehmen, dass CEACAM1 eine wichtige Rolle im Wechselspiel zwischen Endothel und Perizyten einnimmt. So könnte der Verlust von CEACAM1 durch schwächere Adhäsion oder eingeschränkte Migration und Rekrutierung der Perizyten zu einer geringeren Perizytenanzahl in der Netzhaut führen und so den größeren Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie bei *Ceacam1^{-/-}* Mäusen erklären. Neben quantitativen Veränderungen könnte zusätzlich die Signaltransduktion zwischen den beiden Zelltypen gestört sein. Da CEACAM1L durch seine ITIMs in der zytoplasmatischen Domäne inhibierende Signale vermittelt, könnte der Verlust von CEACAM1 durch die nun fehlende Kontrolle der Perizyten zu überschießender Endothelzellproliferation führen, womit die die erhöhte Anzahl an Mikroaneurysmen in der Netzhaut der CEACAM1- defizienten Mäuse erklärt wäre. Letztendlich könnte die Funktion der Perizyten selbst gestört sein. Diese Vermutungen sind spekulativ und müssen im Einzelnen noch nachgewiesen werden. Während in diesem Modell am Tag 7 p.p. vor Hyperoxie keine Unterschiede im Perizytenbesatz in der Netzhaut festgestellt werden konnten, gelang Gerstel *et al.* der Nachweis, dass die Anzahl von Perizyten in Tumorgefäßen von *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen geringer ist als in den Kontrolltieren [340]. Aus diesem Grund wären weitere qualitative und quantitative Untersuchungen des Einfluss von CEACAM1 auf Perizyten im Verlauf der ROP sinnvoll.

Eine weitere CEACAM1 exprimierende Zellpopulation sind zytotoxische T- Lymphozyten. Hyperoxie bewirkt innerhalb kurzer Zeit, durch Hochregulierung von endothelialem ICAM1, die Adhäsion und Aktivierung von zytotoxischen T- Lymphozyten mit anschließender FasLinduzierten Apoptose der Gefäße. Aktivierung der Lymphozyten führt dazu, dass mehr CEACAM1 auf der Oberfläche dieser Zellen präsentiert wird [341, 342], insbesondere die Isoformen mit langen zytoplasmatischen Anteil [286]. Nach Bindung von SHP1 an die ITIM-Domänen werden inhibierende Signale vermittelt und die Aktivierung von T- Lymphozyten verringert [343, 344]. In einigen in vitro Studien wurde gezeigt, dass CEACAM1- spezifische Antikörper in verminderter Proliferation, Aktivität und zytotoxischer Funktion von T-Lymphozyten resultieren [345]. In Granulozyten konnten Singer et al. z.B. nachweisen, dass CEACAM1 durch Erk1/2 Aktivierung zur Verzögerung der der FasL- induzierten Apoptose führt [304]. Das Interessante daran ist, dass nur die FasL- induzierte Apoptose verzögert wird, der Signalweg, der zum Gefäßuntergang durch zytotoxischen T- Lymphozyten während der Frühgeborenenretinopathie führt. Caspase-unabhängiger Zelltod wird nicht beeinflusst [346]. Möglicherweise regulieren Perizyten über TGF β , das inhibierend auf Lymphozyten wirkt [345], T- Lymphozyten und vermindern so Vaso-Obliteration. Zusammengefasst bedeutet das, dass das Fehlen von CEACAM1, ob auf Endothelzellen, Perizyten oder T- Zellen selbst, zur Hyperproliferation und Hyperaktivierung von zytotoxischen T- Lymphozyten mit verstärkter FasL-induzierter Apoptose führt, wodurch sich möglicherweise die Unterschiede in der Vaso-Obliteration erklären lassen.

Zusammengefasst sind das sehr viele Möglichkeiten, wie CEACAM1 vor Sauerstoff- induzierten Gefäßuntergang schützen könnte. Hinweise ergeben sich durch die Beobachtung von *Bcl-2*- defizienten Mäuse mit Frühgeborenenretinopathie [347]. CEACAM1 wirkt in Endothelzellen und Perizyten durch vermehrte Expression von Bcl-2 antiapoptotisch [348]. Allerdings weisen *Bcl-2*- defiziente Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren keine Unterschiede in der Vaso-Obliteration, wohl aber beschleunigte Revaskularisierung, auf. Aufgrund dieser Beobachtung muss man annehmen, dass verändertes Überleben von Endothelzellen aus B6.WT- und *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen nicht ausschlaggebend für den unterschiedlichen Gefäßuntergang zu sein scheint, sondern vermutlich unkontrollierte eNOS—Aktivität und veränderte T- Lymphozyten-und Perizytenfunktion. Natürlich wäre es aber auch möglich, dass CEACAM1 in Endothelzellen noch andere, Bcl-2 unabhängige Apoptosewege inhibiert.

4.3 <u>CEACAM1 fördert Revaskularisierung und inhibiert pathologische</u> <u>Neovaskularisationen</u>

Der Phase der Vaso-Obliteration folgen Hypoxie und Zelluntergang. Hypoxische Zellen in den ischämischen Arealen der Netzhaut reagieren mit verstärkter Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren, um die Revaskularisierung anzukurbeln. Gerade diese Zustände, Hypoxie [349] und inflammatorische Stimuli, wie Interferone, Tumornekrosefaktoren und Interleukine [282, 350] sind es, die eine Mobilisierung von CEACAM1 aus intrazellulären Vesikeln und Präsentation auf der Zelloberfläche bewirken [286]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in vivo nachweisen, dass Verlust von CEACAM1 unter ischämischen und inflammatorischen Bedingungen zu verminderter Angiogenese führt. Subkutane Injektion von Matrigel (Matrigel ist eine gelatinöse Mischung aus extrazellulären Matrixproteinen aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkomen), versetzt mit angiogenen Faktoren, führt in Ceacam1^{-/-}- Mäusen zum verminderten Aussprießen von Gefäßen in das Matrigelkissen [298]. Die Ligatur der Femoralarterie führt zu verminderter Kollateralisierung bei Verlust von CEACAM1 [298]. Unter inflammatorischen Bedingungen durch Infektion mit Leishmanien kommt es zu vermindertem Gefäßwachstum in ödematösen Arealen bei den Ceacam1- Knock- Out- Mäusen [297]. Die Frühgeborenenretinopathie ist eine Kombination aus diesen Versuchen. Es herrschen sowohl relativer Sauerstoffmangel und Entzündungsreaktionen. Konsistent mit obigen Befunden führt der Verlust von CEACAM1 unter diesen Bedingungen zu einer verminderten Revaskularisierung der ischämischen Netzhautareale. Es ist fraglich, ob der Effekt von den Endothelzellen selbst ausgeht, da die physiologische Gefäßbildung bei *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen nicht beeinträchtigt ist, der grundlegende Mechanismus des Aussprießens derselbe sein dürfte und die Länge der Tip-Zellen in *Ceacam1^{-/-}*-Mäusen und Kontrolltieren ähnlich ist. Allerdings kommt es durch Hypoxie und Zelluntergang zu einem Influx von inflammatorischen Zellen in die Netzhaut. In CEACAM1kompetenten und CEACAM1- negativen Mäusen könnte so ein verändertes Profil von Wachstumsfaktoren und Zytokinen für die Effekte der unterschiedlichen Gefäßneubildung verantwortlich sein. Veränderte oder verminderte Konzentrationen von angiogenen Faktoren, bzw. der Zellen, die sie produzieren, könnten erklären, warum einige der Tip-Zellen in *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen rarefiziert aussehen. Es fehlen vermutlich die Stimuli, die das Signal zum Aussprießen geben. Es könnte natürlich sein, dass die Stalk- Zellen schneller proliferieren, aber der Versuchsaufbau ist nicht dazu geeignet, um solche Unterschiede festzustellen.

Neben verzögerter Revaskularisierung kommt es bei den *Ceacam1^{-/-}*-Mäusen zu fokalem, überschießendem Gefäßwachstum mit Bildung von signifikant mehr Mikroaneurysmata und verlangsamten Abbau derselben. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre wieder eine veränderte Anzahl von gefäßstabilisierenden Perizyten in der Netzhaut, die ähnlich wie CEACAM1- tragendes Epithel, überschießende Endothelproliferation inhibieren, was weiter oben bereits im Detail erörtert wurde.

Zusätzlich sind CD11b-positive Zellen von entscheidender Bedeutung für die Vorgänge der Revaskularisierung, worüber im Folgenden diskutiert wird.

4.4 CD11b und CEACAM1

In den letzten Jahren sind CD45+/CD11b⁺- Knochenmarkszellen (BMDCs) in den Mittelpunkt der Angiogeneseforschung gerückt. Viele Untersuchungen an Tumoren konnte zeigen, dass sie hauptverantwortlich sind für Tumor- induziertes Gefäßwachstum [317, 351-353]. So führt die Injektion von CD11b⁺ Knochenmarkszellen in verschiedene Tumoren zu einer Zunahme der Gefäßdichte, Gefäßreife und verminderter Nekrose [351]. Einige Mechanismen, wie BMDCs wirken, konnten mittlerweile entschlüsselt werden [317]. Ähnlich wie die Netzhaut während der ROP leiden Tumoren aufgrund des schnellen Wachstums an Sauerstoffmangel. Über die HIF1 α - Signalkaskade kommt es zur Heraufregulation von VEGF und SDF1 α . Beide Moleküle wirken über ihre Rezeptoren VEGFR1 und CXCR4 chemotaktisch auf CD45⁺/CD11b⁺-Knochenmarksvorläuferzellen und locken diese Zellen in die ischämischen Areale von Tumoren. Diese HIF1α- abhängige Rekrutierung von CD11b⁺ Knochenmarkszellen in die Bereiche der Vaso-Obliteration konnte mittlerweile für die Netzhaut bestätigt werden [314]. Die rekrutierten Zellen produzieren verschiedene angiogene Substanzen, insbesondere die Metalloproteinase MMP9 [354]. Dieses Enzym erhöht über Abbau der extrazellulären Matrix die Freisetzung und Bioverfügbarkeit von gebundenem VEGF und fördert so angiogene Prozesse. Gleichzeitig werden durch MMP9 Perizytenvorläufer (PPCs) rekrutiert, die, wie zuvor erwähnt, zur Stabilität der neu gebildeten Gefäße und Endothelzellüberleben beitragen [317]. Einigen Studien zufolge integrieren sich die rekrutierten Knochenmarkzellen sogar in die neu gebildeten Gefäße und werden zu Endothelzellen [351].

Das Interessante obiger Versuche für diese Arbeit ist, dass CD11b⁺- BMDCs die Zellpopulation ist, die CEACAM1 am stärksten exprimiert, sodass die Hypothese naheliegt, dass CEACAM1 für die Regulation dieser Zellen von Bedeutung ist. Zusätzlich exprimieren CD11b⁺- MDSCs kein PECAM1 [351]. Da sich CEACAM1 und PECAM1 ähneln, sowohl strukturell als auch in der Signaltransduktion, nimmt man an, dass PECAM1 einen Verlust von CEACAM1 kompensiert. So könnte der Verlust von CEACAM1 auf den PECAM1⁻/CD11b⁺- MDSCs größere Auswirkungen haben als auf Endothelzellen. Die einzigen unter physiologischen Bedingungen vorkommenden CD11b⁺/CEACAM1⁺- Zellen der Netzhaut sind Mikroglia [239]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass diese Zellen wichtige Regulatoren des retinalen Gefäßnetzwerkes sind. So schützen sie bei Hyperoxie vor Gefäßuntergang [239]. BALB/cByJ- Mäuse haben eine höhere Dichte an Mikroglia als C57BL/6J- Mäuse und sind weniger von Vaso-Obliteration und Neovaskularisationen während der ROP betroffen [239]. Zusätzlich konnten Ritter *et al.* zeigen, dass CD11b- positive Zellen nach intraokulärer Injektion zu Mikroglia differenzieren und Revaskularisierung und Abbau der Mikroaneurysmata dramatisch beschleunigen [239], wobei die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass CEACAM1 möglicherweise residente Mikroglia aktiviert sowie eventuell die Rekrutierung, Differenzierung und das Überleben CD11b⁺- BMDCs fördert, und somit die Unterschiede der Revaskularisierung zwischen *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen und Kontrolltieren erklärt werden können.

Funktionell lässt sich das zum einem dadurch erklären, dass CEACAM1L Apoptose inhibiert und über die PI3K/Akt- Signalkaskade das Überleben humaner Monozyten, Vorläuferzellen der Mikroglia, fördert [348]. Höhere Dichte an Mikroglia während der Hypoxie bedeutet wiederum schnellere Revaskularisierung und Abbau der Mikroaneurysmata.

Eine weitere mögliche Erklärung liefert die Beobachtung der Expression des Proteins Iba1 in den Mikroglia- Zellen. In ramifizierten Mikroglia ist Iba1 um den Zellkern lokalisiert. Bei der Aktivierung der Zelle interagiert Iba1 mit Aktin und verteilt sich vom Zellkern in die Peripherie der Zelle. So organisiert Iba1 das Remodelling des Zytoskeletts, das notwendig ist für Migration- und Phagozytosevorgänge [316, 355]. CEACAM1 interagiert mit Aktin, wobei man annimmt, dass CEACAM1 die Polymerisation von Aktin reguliert [280, 356]. Mikroglia in *Ceacam1^{-/-}-* Mäusen zeigen eine geringere Expression von Iba1 bei unveränderter Lokalisation von Iba1 um den Zellkern, was eine Desorganisation der Aktinfilamente und verminderte Aktivierung der Zellen spricht. Fehlen von CEACAM1 führt so möglicherweise über fehlerhafte Aktinpolymerisation zu verminderter Plastizität der Zelle mit geringeren Phagozytoseeigenschaften und Migrationspotential.

An Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 über Interaktion mit β 3- Integrinen Migration und Invasion fördert [357]. Dieser Befund ist unter anderem für Transplantationsversuche interessant. CD11b⁺- BMDCs aus *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen integrieren nach intraokulärer Injektion nicht in die Netzhaut und differenzieren nicht zu Mikroglia. Stattdessen bleiben sie auf der Membrana limitans interna liegen und gehen zugrunde. Möglicherweise können diese Zellen durch Abwesenheit von CEACAM1, und damit fehlender Interaktion mit β 3- Integrinen, die innere retinale Grenzmembran nicht durchdringen und in die Retina migrieren. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass eventuell die Rekrutierung dieser Zellen aus dem peripheren Blut beeinträchtigt ist und so weniger CD11b⁺- Zellen die Revaskularisierung der Netzhaut bewerkstelligen müssen.

Passend zu der Annahme, dass CD11b⁺- Zellen direkt in neu entstehende Gefäße integriert werden [317, 351, 353], konnten Horst *et al.* zeigen, dass Makrophagen röhrenförmige, gefäßähnliche Strukturen ausbilden, während dieselbe Zellpopulation aus *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen dazu nicht in der Lage ist [297]. Durch die Transplantationen von CD11b⁺ Zellen ins Auge konnte nicht der Nachweis erbracht werden, dass diese Zellen zu Endothelzellen differenzieren. Allerdings adhärieren CD11b⁺ positive Zellen an sich neu entwickelnde Zellen und überbrücken aufeinander zuwachsende Endothelzellen, entweder um den Endothelzellen den Weg zu leiten oder um tatsächlich später in das Gefäßnetzwerk integriert zu werden und so Angiogenese zu fördern. Inwieweit CD11b⁺- BMDCs aus *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen dazu in der Lage sind, konnte in diesen Versuchen nicht gezeigt werden, da die intraokulär- injizierten

74

Zellen nicht in die Netzhaut integrierten. Aufgrund der Versuche von Horst *et al.* lässt sich vermuten, dass auch in der Netzhaut die Funktion dieser Zellen eingeschränkt ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 möglicherweise ein wichtiges Schlüsselmolekül von CD11b⁺- Zellen ist, sie aktiviert und Migration, Invasion, Plastizität und Differenzierung dieser Zellen ermöglicht. Da CD11b⁺- Zellen wichtige Mediatoren von Angiogenese sind, vermittelt CEACAM1 eventuell über diese Zellen sein angiogenes Potential.

4.5 <u>Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick</u>

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen der Verlust von CEACAM1 nicht kompensiert werden kann und vermehrter Gefäßuntergang und verzögerte Revaskularisierung die Folgen sind, während die physiologische postnatale Entwicklung der retinalen Gefäße in CEACAM1-defizienten Mäusen unter normoxischen Bedingungen nicht gestört ist.

In der ersten Phase der ROP schützt CEACAM1 Endothelzellen vor dem schädigendem Einfluss der Hyperoxie durch negative Regulation der eNOS und folglich verminderten Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies und geringeren Vaso-Obliterationen.

Im Anschluss an den Gefäßuntergang beschleunigt CEACAM1 auf CD11b⁺- Zellen möglicherweise Revaskularisierungsvorgänge. Hypoxie und Inflammation führen zu einer vermehrten Rekrutierung dieser Zellen und sie exprimieren kein PECAM1 [351], das den Verlust von CEACAM1 kompensieren könnte. Somit lassen sich einige der beobachteten Phänomene mit Hilfe der CD11b⁺- Zellen erklären und es wird immer deutlicher, dass viele der Effekte von CEACAM1 *"in vivo"* nicht nur dem Endothel, sondern auch CD11b⁺- Zellen, und anderen Leukozyten und Perizyten, die von einer CEACAM1- positiven Umgebung abhängig sind, zuzuschreiben sind.

Allerdings muss eingeräumt werden, dass weitere Versuche erbracht werden müssen und die Diskussion in weiten Teilen neue Fragen aufwirft. Dazu zählen unter anderem Dichte und Überleben von Perizyten und Mikroglia und der Nachweis, ob die injizierten CD11b⁺ BMDCs tatsächlich die Revaskularisierung beschleunigen. Sollte sich nämlich CEACAM1 tatsächlich als wichtiges Schlüsselmolekül dieser Zellpopulation herausstellen, hätte das aus klinischer Sicht hohe Relevanz. So könnte man mit CEACAM1- Antikörpern die durch CD11b- induzierte Tumorangiogenese inhibieren, im gleichen Schritt aber, durch Injektion dieser Zellen ins Auge, vasoproliferative Augenkrankheiten günstig beeinflussen.

5 Zusammenfassung

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 durch hypoxische und entzündliche Vorgänge hochreguliert wird und durch Stimulierung von Angiogenese und Kollateralisierung diesen Zuständen entgegenwirkt. Ursächlich für viele angioproliferative Augenerkrankungen sind Hypoxie und Inflammation, weswegen anzunehmen ist, dass CEACAM1 bei diesen Krankheiten eine Rolle spielt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von CEACAM1 auf angioproliferative Augenerkrankungen zu beschreiben. Als Modell für die angioproliferativen Netzhauterkrankungen wurde die Frühgeborenenretinopathie in der Maus gewählt. Bei diesem Krankheitsbild kommt es bei neugeborenen Mäusen durch Hyperoxie zunächst zu Gefäßuntergang. Aufgrund der nun fehlenden Gefäße leiden die Zellen der Netzhaut nach Transfer in Raumluft an relativem Sauerstoffmangel, was zu einer massiven Ausschüttung von proangiogenen Wachstumsfaktoren mit Bildung von Mikroaneurysmen führt. In der letzten Phase der Frühgeborenenretinopathie werden diese pathologischen Neovaskularisationen abgebaut und die avaskulären, retinalen Bereiche revaskularisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CEACAM1 zu einem größeren Gefäßuntergang während anschließenden, der Hyperoxie mit vermehrten Neovaskularisationen führt. Die erhöhte Empfindlichkeit des Endothels gegenüber Sauerstoff in *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen liegt vermutlich an einer gesteigerten Aktivität des Enzyms eNOS, das durch CEACAM1 negativ reguliert wird und reaktive Sauerstoffspezies produziert, die das Endothel schädigen. Zugleich ist der Abbau der Neovaskularisationen bei den Ceacam1^{-/-}-Mäusen verzögert, genauso wie die Revaskularisierung. Möglicherweise werden diese Effekte von CEACAM1 über Mikroglia vermittelt. Mikroglia schützen nachweislich vor Gefäßuntergang in der Netzhaut und fördern Revaskularisierung. In den Ceacam1^{-/-}- Mäusen wiesen mehr Mikroglia eine ruhende, sogenannte ramifizierte Morphologie auf. Zusätzlich war die Expression von Iba1, einem Aktivitätsmarker von Mikroglia, vermindert, sodass CEACAM1 möglicherweise in die Aktivierung von Mikroglia involviert ist. Um die Rolle von CEACAM1 in der Regulation von Mikroglia zu bestätigen, wurden CD11b- positive Zellen, die in der Netzhaut zu Mikroglia differenzieren, aus B6.WT und B6. *Ceacam1^{-/-}-* Mäusen in die Augen von Mäusen mit Frühgeborenenretinopathie injiziert. Die Zellen, denen CEACAM1 fehlte, konnten im Gegensatz zu CEACAM1- positive Zellen nicht in die Netzhaut migrieren und zu Mikroglia differenzieren. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind auch andere CEACAM1- exprimierende Zellen an der Pathogenese der Frühgeborenenretinopathie beteiligt, z.B. Endothelzellen,

Perizyten und T- Lymphozyten. Die Tip- Zellen der Endothelzellen zeigten in B6.WT und B6. *Ceacam1^{-/-}*- Mäusen allerdings keine Unterschiede in der Länge. Die Rolle der Perizyten und T-Lymphozyten wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht, sodass nur Hypothesen aufgestellt werden konnten, die noch bestätigt oder widerlegt werden müssen.

Zusammenfassend bestätigen die Versuche dieser Arbeit, dass der Verlust von CEACAM1 zwar unter physiologischen Bedingungen keine Auswirkungen auf die Gefäßentwicklung hat, hingegen unter Hypoxie und Inflammation viele Prozesse, wie Angiogenese, beeinträchtigt sind. Außerdem lassen einige Ergebnisse vermuten, dass CEACAM1 viele seiner Effekte nicht nur über endotheliale Zellen sondern auch über andere Zellpopulationen, wie CD11b- positive Zellen, vermittelt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ang: Angiopoietin Bcl-2: B-cell lymphoma 2 BMDC: bone marrow derived cell CADASIL: autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie CCL2: Chemokin2 der CC- Familie CEA: Carcinoembryonales Antigen CEACAM: CEA-related cell adhesion molecules CTL: Zytotoxische T- Zellen DGNF: glial cell line-derived neurotrophic factor Dll: Delta- like protein EC: Endothelial cell ECM: Extrazelluläre Matrix eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase **EPO:** Erythropoetin FasL: Fas- Ligand FGF: Fibroblast growth factor flk-1: fetal liver kinase-1 flt-1: fms- like- tyrosin- kinase-1 flt-4: fms- like- tyrosin- kinase-4 GM-CSF: Granulocyte/ monocyte colony stimulating factor HDMEC: humanen dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen HIF1: Hypoxie induzierbarer Faktor 1 HRE: HIF- responsive element ICAM: Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 IgSF: Immunglobulin-Superfamilie iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs M-CSF: Monocyte colony stimulating factor MPS: Monozytären- Phagozyten- System NF-ĸB: Nuclear factor kappa B NG2: Nerval/Glial antigen NO: Stickstoffmonoxid NP: Neuropilin p.p.: post partum PDGF: Platelet-Derived Growth Factor PECAM1: platelet endothelial cell adhesion molecule PHD: Hydroxylase-Domänen-Enzyme PLGF: Placental growth factors PSG: Pregnancy-specific glykoproteins pVHL: Hippel- Lindau Tumorsupressor Protein ROP: Retinopathy of prematurity ROS: reactive oxygen species **RPE:** Retinales Pigmentepithel RTK: Rezeptor- Tyrosin Kinasen SDF1 α : stromal cell-derived factor 1 α SHP1: Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1; Src homology region 2 domaincontaining phosphatase-2 TGF-β-1: Transforming growth factor-1 tie-2: Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains VEGF: Vascular endothelial growth factor VEGFR: VEGF- Rezeptor VPF: vascular permeability factor ZNS: Zentralnervensystem

7 <u>Abbildungsverzeichnis</u>

Abb. 1.1 Die geologische Zeitskala	1
Abb. 1.2 Ursachen für Erblindung in Deutschland	3
Abb. 1.3 Demographischer Wandel in Deutschland	4
Abb. 1.4 Entwicklung des Blutgefäßsystems	6
Abb. 1.5 Der Hypoxie- induzierbare Faktor 1 (HIF1)	8
Abb. 1.6 Das Auge	18
Abb. 1.7 Hypoxie in der Retina	19
Abb. 1.8 Angiogenese in der Netzhaut	20
Abb. 1.9 Mikroglia	23
Abb. 1.10 Wirkung von Zelladhäsionmoleküle	29
Abb. 1.11 Aufbau und Struktur von CEACAM1 und seinen Splicevarianten (aus [285])	32
Abb. 3.1 Primärer retinaler Gefäßplexus an Tag 7	47
Abb. 3.2 Darstellung der Perizyten im primären retinalen Gefäßplexus am Tag 7	48
Abb. 3.3 Retinale Gefäße nach 12 Tagen (A-C) und 12 Wochen (D-F)	49
Abb. 3.4 CEACAM1- Expression in der Netzhaut	50
Abb. 3.5 Vaso-Obliteration nach 24h Hyperoxie	51
Abb. 3.6 Vaso-Obliteration P12	53
Abb. 3.7 Gefäßreife nach fünf Tagen Hyperoxie	54
Abb. 3.8 Verlust von CEACAM1 in <i>B6.Ceacam1^{-/-}-</i> Mäusen führt zu einer Zunahme	
von Vaso-Obliterationen und Neovaskularisation am Tag 17	56
Abb. 3.9 Verlust von CEACAM1 in B6. <i>Ceacam1^{-/-}-</i> Mäusen führt zu einer Zunahme	
von Vaso-Obliterationen und Neovaskularisation am Tag 19	57
Abb. 3.10 Verlust von CEACAM1 in B6. <i>Ceacam1^{-/-}-</i> Mäusen führt zu einer	
Verzögerung der Revaskularisation und verlangsamten Abbau von	
Neovaskularisationen	58
Abb. 3.11 Die Tip- Zellen in B6. <i>Ceacam1^{-/-}-</i> Mäusen	59
Abb. 3.12 Verlust von CEACAM1 in B6. <i>Ceacam1^{-/-}-</i> Mäusen führt zu verminderter	
Aktivierung von Mikroglia- Zellen	60
Abb. 3.13 Verlust von CEACAM1 in B6.Ceacam1 ^{-/-} - Mäusen führt zu verminderter	
Rekrutierung von CD11b+- BMDCs in ischämische Areale nach intravitrealer	
Injektion dieser Zellen	62
Abb. 3.14 Verlust von CEACAM1 in CD11b+- BMDCs aus B6.Ceacam1 ^{-/-} - Mäusen führt	
zu einem verminderten Migrations-, Invasions- und Differenzierungspotential dieser	
Zellen	63
Abb. 3.15 CD11b+- BMDCs aus B6.WT- Mäusen adhärieren an sich entwickelnde	
Gefäße und vermitteln so eventuell das angiogene Potential von CEACAM1	64
Abb. 3.16 Die intravitreale Injektion hat einen großen Einfluss auf die	
Gefäßentwicklung während der ROP	64

8 Literaturverzeichnis

- 1. Drenckhahn, D., Anatomie : makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 15., völlig neu bearbeitete Aufl. / ed. 1994, München ; Baltimore: Urban & Schwarzenberg.
- 2. Klinke, R., *Lehrbuch der Physiologie*. 1994, Stuttgart ; New York: Thieme. xiii, 808 p.
- 3. Parker, A., *In the blink of an eye*. 2003, Cambridge, MA: Perseus Pub. 316 p., [16] p. of plates.
- Lenski, R.E., et al., *The evolutionary origin of complex features*. Nature, 2003.
 423(6936): p. 139-44.
- 5. Ings, S., *The eye : a natural history*. 2007, London ; New York: Bloomsbury. 322 p., [16] p. of plates.
- 6. Ings, S., *A natural history of seeing : the art and science of vision*. 1st American ed. 2008, New York: W.W. Norton. 322 p., [16] p. of plates.
- 7. Nilsson, D.E. and S. Pelger, *A pessimistic estimate of the time required for an eye to evolve.* Proc Biol Sci, 1994. **256**(1345): p. 53-8.
- 8. Carabellese, C., et al., *Sensory impairment and quality of life in a community elderly population.* J Am Geriatr Soc, 1993. **41**(4): p. 401-7.
- 9. Wallhagen, M.I., et al., *Comparative impact of hearing and vision impairment on subsequent functioning.* J Am Geriatr Soc, 2001. **49**(8): p. 1086-92.
- 10. Fitzgerald, R.G., *Reactions to blindness. An exploratory study of adults with recent loss of sight.* Arch Gen Psychiatry, 1970. **22**(4): p. 370-9.
- 11. Fitzgerald, R.G., J.N. Ebert, and M. Chambers, *Reactions to blindness: a four-year follow-up study.* Percept Mot Skills, 1987. **64**(2): p. 363-78.
- 12. Wang, J.J., et al., *Visual impairment, age-related cataract, and mortality.* Arch Ophthalmol, 2001. **119**(8): p. 1186-90.
- 13. Lam, B.L., et al., *Reported visual impairment and risk of suicide: the 1986-1996 national health interview surveys.* Arch Ophthalmol, 2008. **126**(7): p. 975-80.
- 14. GALLUP, Poll: Which disease do you fear most ? 1960-1970.
- 15. Leibowitz, H.M., et al., *The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975.* Surv Ophthalmol, 1980. **24**(Suppl): p. 335-610.
- Klein, R., et al., *The Beaver Dam Eye Study: visual acuity*. Ophthalmology, 1991. 98(8):
 p. 1310-5.
- 17. Attebo, K., P. Mitchell, and W. Smith, *Visual acuity and the causes of visual loss in Australia. The Blue Mountains Eye Study.* Ophthalmology, 1996. **103**(3): p. 357-64.
- Munoz, B., et al., Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans: The Salisbury Eye Evaluation Study. Arch Ophthalmol, 2000. 118(6): p. 819-25.
- 19. van der Pols, J.C., et al., *Visual acuity measurements in a national sample of British elderly people.* Br J Ophthalmol, 2000. **84**(2): p. 165-70.
- 20. Evans, J.R., et al., *Prevalence of visual impairment in people aged 75 years and older in Britain: results from the MRC trial of assessment and management of older people in the community.* Br J Ophthalmol, 2002. **86**(7): p. 795-800.
- 21. Evans, B.J. and G. Rowlands, *Correctable visual impairment in older people: a major unmet need.* Ophthalmic Physiol Opt, 2004. **24**(3): p. 161-80.
- 22. Evans, J.R., A.E. Fletcher, and R.P. Wormald, *Age-related macular degeneration causing* visual impairment in people 75 years or older in Britain: an add-on study to the Medical

Research Council Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. Ophthalmology, 2004. **111**(3): p. 513-7.

- 23. Evans, J.R., A.E. Fletcher, and R.P. Wormald, *Causes of visual impairment in people* aged 75 years and older in Britain: an add-on study to the MRC Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(3): p. 365-70.
- Pascolini, D., et al., 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. Ophthalmic Epidemiol, 2004.
 11(2): p. 67-115.
- 25. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 2004. **82**(11): p. 844-51.
- 26. Seland, J.H., et al., *Visual Impairment and quality of life in the Older European Population, the EUREYE study.* Acta Ophthalmol, 2009.
- 27. Krumpaszky, H.G., et al., [New blindness incidents in Wurttemberg-Hohenzollern]. Ophthalmologe, 1997. **94**(3): p. 234-6.
- Krumpaszky, H.G. and V. Klauss, *Epidemiology of blindness and eye disease*.
 Ophthalmologica, 1996. **210**(1): p. 1-84.
- 29. Bundesamt, S. (2003) *Bevölkerung Deutschlands bis 2050 10. koordinierte Bevölkerungsvorrausberechnung- Presseexemplar.*
- 30. Knauer, C. and N. Pfeiffer, *[Blindness in Germany--today and in 2030]*. Ophthalmologe, 2006. **103**(9): p. 735-41.
- 31. *Ich sehe so, wie du nicht siehst Wie lebt man mit einer Sehbehinderung?* 2008, Deutscher Blinden- und Sehbehindertenverband e.V.
- 32. Anhaltspunkte für die ärztliche Gutachtertätigkeitim sozialen Entschädigungsrecht und nach dem Schwerbehindertengesetz, B.f.A.u. Sozialordung, Editor. 1983.
- 33. Trautner, C., et al., *Incidence of blindness in southern Germany due to glaucoma and degenerative conditions.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(3): p. 1031-4.
- 34. Trautner, C., et al., *Incidence of blindness in southern Germany between 1990 and 1998.* Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 147-50.
- 35. Ziemssen, F., *Innovative Therapien für eine häufige Erblindungsursache*. Pharmazeutische Zeitung, 2006. **23**: p. 1395.
- 36. Augood, C.A., et al., *Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE)*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(4): p. 529-35.
- 37. Schrader, W.F., [Age-related macular degeneration: a socioeconomic time bomb in our aging society]. Der Ophthalmologe: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 2006. **103**(9): p. 742-8.
- 38. Finger, R.P., [Blindness in Germany: dimensions and perspectives]. Ophthalmologe, 2007. **104**(10): p. 839-44.
- 39. Flamme, I., T. Frolich, and W. Risau, *Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis*. J Cell Physiol, 1997. **173**(2): p. 206-10.
- 40. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 73-91.
- 41. Flamme, I. and W. Risau, *Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro*. Development, 1992. **116**(2): p. 435-9.
- 42. Risau, W., et al., *Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies.* Development, 1988. **102**(3): p. 471-8.
- 43. Flamme, I., G. Breier, and W. Risau, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo.* Dev Biol, 1995. **169**(2): p. 699-712.
- 44. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.

- 45. Djonov, V., O. Baum, and P.H. Burri, *Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 107-17.
- 46. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
- 47. Buschmann, I. and W. Schaper, *The pathophysiology of the collateral circulation* (arteriogenesis). J Pathol, 2000. **190**(3): p. 338-42.
- 48. Helisch, A. and W. Schaper, *Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription*. Z Kardiol, 2000. **89**(3): p. 239-44.
- 49. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
- 50. Wang, H.U., Z.F. Chen, and D.J. Anderson, *Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4.* Cell, 1998. **93**(5): p. 741-53.
- 51. Swift, M.R. and B.M. Weinstein, *Arterial-venous specification during development*. Circ Res, 2009. **104**(5): p. 576-88.
- 52. Aitsebaomo, J., et al., *Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity*. Circ Res, 2008. **103**(9): p. 929-39.
- 53. Gerety, S.S., et al., *Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development*. Mol Cell, 1999. **4**(3): p. 403-14.
- 54. Folkman, J. and P.A. D'Amore, *Blood vessel formation: what is its molecular basis?* Cell, 1996. **87**(7): p. 1153-5.
- 55. D'Amore, P.A. and D.T. Shima, *Tumor angiogenesis: a physiological process or genetically determined?* Cancer Metastasis Rev, 1996. **15**(2): p. 205-12.
- 56. Benizri, E., A. Ginouves, and E. Berra, *The magic of the hypoxia-signaling cascade*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(7-8): p. 1133-49.
- 57. Semenza, G.L., *HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 167-71.
- 58. Manalo, D.J., et al., *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. Blood, 2005. **105**(2): p. 659-69.
- 59. Semenza, G.L., *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level.* Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 176-82.
- 60. Semenza, G.L., *Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 405-6.
- 61. Ema, M., et al., A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxiainducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4273-8.
- Wang, G.L., et al., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(12): p. 5510-4.
- 63. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
- 64. Ivan, M., et al., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
- Salceda, S. and J. Caro, Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. J Biol Chem, 1997.
 272(36): p. 22642-7.

- 66. Epstein, A.C., et al., *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell, 2001. **107**(1): p. 43-54.
- 67. Gnaiger, E., et al., *Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell. Effect of ADP on oxygen kinetics.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1365**(1-2): p. 249-54.
- 68. Hagen, T., et al., *Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1975-8.
- 69. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
- 70. Yu, F., et al., *Dynamic, site-specific interaction of hypoxia-inducible factor-1alpha with the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.* Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 4136-42.
- 71. Hewitson, K.S., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family.* J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26351-5.
- 72. Koivunen, P., et al., *Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases.* J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9899-904.
- 73. Semenza, G.L. and G.L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
- 74. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4304-8.
- 75. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.* J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21513-8.
- 76. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction.* Blood, 1993. **82**(12): p. 3610-5.
- 77. Firth, J.D., et al., *Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6496-500.
- Semenza, G.L., O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. J Appl Physiol, 2004. 96(3): p. 1173-7; discussion 1170-2.
- 79. Cummins, E.P. and C.T. Taylor, *Hypoxia-responsive transcription factors*. Pflugers Arch, 2005. **450**(6): p. 363-71.
- 80. Chen, F., et al., *New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases.* Clin Chem, 1999. **45**(1): p. 7-17.
- 81. Chandel, N.S., et al., *Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin.* J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1013-21.
- 82. Koong, A.C., et al., *Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2).* Cancer Res, 1994. **54**(20): p. 5273-9.
- Leeper-Woodford, S.K. and K. Detmer, Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kappaB expression. Am J Physiol, 1999.
 276(6 Pt 1): p. L909-16.
- 84. Matsui, H., et al., *Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes.* Cardiovasc Res, 1999. **42**(1): p. 104-12.
- 85. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.

- 86. Janeway, C., Jr. and R. Medzhitov, *Viral interference with IL-1 and toll signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10682-3.
- 87. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
- 88. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.* Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
- 89. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2413-22.
- 90. Ferrara, N. and S. Bunting, *Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 1996. **5**(1): p. 35-44.
- 91. Karkkainen, M.J., T. Makinen, and K. Alitalo, *Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. E2-5.
- 92. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.* J Biol Chem, 1991.
 266(18): p. 11947-54.
- 93. Houck, K.A., et al., *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(12): p. 1806-14.
- 94. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
- 95. Houck, K.A., et al., *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms.* J Biol Chem, 1992. **267**(36): p. 26031-7.
- 96. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF.* Mol Biol Cell, 1993. **4**(12): p. 1317-26.
- 97. Keyt, B.A., et al., *The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency.* J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7788-95.
- 98. Carmeliet, P., et al., *Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188.* Nat Med, 1999. **5**(5): p. 495-502.
- 99. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 789-91.
- 100. Ferrara, N., *VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth.* Eur Cytokine Netw, 2009. **20**(4): p. 158-63.
- 101. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
- 102. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
- 103. de Vries, C., et al., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor.* Science, 1992. **255**(5047): p. 989-91.
- 104. Terman, B.I., et al., Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 187(3): p. 1579-86.
- 105. Favier, B., et al., *Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration.* Blood, 2006. **108**(4): p. 1243-50.
- 106. Neufeld, G., O. Kessler, and Y. Herzog, *The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF.* Advances in experimental medicine and biology, 2002. **515**: p. 81-90.

- 107. Gluzman-Poltorak, Z., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes.* J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18688-94.
- 108. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.* Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
- 109. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.* FASEB J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
- Maru, Y., S. Yamaguchi, and M. Shibuya, *Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials.* Oncogene, 1998. 16(20): p. 2585-95.
- 111. Tjwa, M., et al., *VEGF and PIGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis.* Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 5-14.
- 112. Luttun, A., et al., *Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1.* Nat Med, 2002. **8**(8): p. 831-40.
- 113. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor* activity by an endogenously encoded soluble receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993.
 90(22): p. 10705-9.
- 114. Fong, G.H., et al., *Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice.* Development, 1999. **126**(13): p. 3015-25.
- 115. Fong, G.H., et al., *Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium.* Dev Dyn, 1996. **207**(1): p. 1-10.
- 116. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.* Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
- 117. Hiratsuka, S., et al., *MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis.* Cancer Cell, 2002. **2**(4): p. 289-300.
- 118. Park, J.E., et al., *Placenta growth factor*. *Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25646-54.
- 119. Carmeliet, P., et al., *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.* Nat Med, 2001. **7**(5): p. 575-83.
- 120. Maye, P., et al., *Indian hedgehog signaling in extraembryonic endoderm and ectoderm differentiation in ES embryoid bodies*. Mech Dev, 2000. **94**(1-2): p. 117-32.
- 121. Riese, J., R. Zeller, and R. Dono, *Nucleo-cytoplasmic translocation and secretion of fibroblast growth factor-2 during avian gastrulation.* Mech Dev, 1995. **49**(1-2): p. 13-22.
- 122. Cox, C.M. and T.J. Poole, Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 371-82.
- 123. Faloon, P., et al., *Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development*. Development, 2000. **127**(9): p. 1931-41.
- 124. Wilting, J. and B. Christ, *Embryonic angiogenesis: a review*. Naturwissenschaften, 1996.
 83(4): p. 153-64.
- 125. Kotch, L.E., et al., Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. Dev Biol, 1999.
 209(2): p. 254-67.
- 126. Ema, M., et al., *Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse.* Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 380-93.

- 127. Gering, M., et al., *Lmo2 and Scl/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1.* Development, 2003. **130**(25): p. 6187-99.
- 128. Vokes, S.A. and P.A. Krieg, *Endoderm is required for vascular endothelial tube* formation, but not for angioblast specification. Development, 2002. **129**(3): p. 775-85.
- 129. Schuh, A.C., et al., *In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2159-64.
- Hidaka, M., W.L. Stanford, and A. Bernstein, *Conditional requirement for the Flk-1* receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(13): p. 7370-5.
- 131. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1deficient mice.* Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
- 132. Plendl, J., *Angiogenesis and vascular regression in the ovary*. Anat Histol Embryol, 2000. **29**(5): p. 257-66.
- 133. Kaufman, D.S., et al., *Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells.* Blood, 2004. **103**(4): p. 1325-32.
- 134. Lienau, J., et al., Morphology and transfection study of human microvascular endothelial cell angiogenesis: an in vitro three-dimensional model. Biol Chem, 2005.
 386(2): p. 167-75.
- 135. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J. Cell Biol., 2003. **161**(6): p. 1163-1177.
- 136. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.* J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
- 137. Nakatsu, M.N., et al., *VEGF(121)* and *VEGF(165)* regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. Lab Invest, 2003. **83**(12): p. 1873-85.
- Ruhrberg, C., et al., Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. Genes Dev, 2002. 16(20): p. 2684-98.
- 139. Fruttiger, M., *Development of the retinal vasculature*. Angiogenesis, 2007. **10**(2): p. 77-88.
- 140. Stone, J. and Z. Dreher, *Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina.* J Comp Neurol, 1987. **255**(1): p. 35-49.
- 141. Samakovlis, C., et al., *Genetic control of epithelial tube fusion during Drosophila tracheal development*. Development, 1996. **122**(11): p. 3531-6.
- 142. Samakovlis, C., et al., *Development of the Drosophila tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events.* Development, 1996. **122**(5): p. 1395-407.
- 143. Eichmann, A., et al., *Guidance of vascular and neural network formation*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(1): p. 108-15.
- 144. Marin-Padilla, M., *Early vascularization of the embryonic cerebral cortex: Golgi and electron microscopic studies.* J Comp Neurol, 1985. **241**(2): p. 237-49.
- 145. Dorrell, M.I., E. Aguilar, and M. Friedlander, *Retinal Vascular Development Is Mediated* by Endothelial Filopodia, a Preexisting Astrocytic Template and Specific R-Cadherin Adhesion. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002. **43**(11): p. 3500-3510.
- Hanahan, D., Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science, 1997.
 277(5322): p. 48-50.

- 147. Liu, Z.J., et al., *Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 14-25.
- 148. Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M.E. Fortini, *Notch signaling*. Science, 1995. **268**(5208): p. 225-32.
- 149. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.* Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
- 150. Joutel, A., et al., *Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis.* Lancet, 2001. **358**(9298): p. 2049-51.
- 151. Joutel, A., et al., *Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia.* Nature, 1996. **383**(6602): p. 707-10.
- 152. Hrabe de Angelis, M., J. McIntyre, 2nd, and A. Gossler, *Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 717-21.
- 153. Huppert, S.S., et al., *Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1.* Nature, 2000. **405**(6789): p. 966-70.
- 154. Xue, Y., et al., *Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1.* Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 723-30.
- 155. Krebs, L.T., et al., *Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants.* Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2469-73.
- 156. Duarte, A., et al., *Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2474-8.
- 157. Zhong, T.P., et al., gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. Science, 2000. **287**(5459): p. 1820-4.
- 158. Fischer, A., et al., *The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development*. Genes Dev, 2004. **18**(8): p. 901-11.
- 159. You, L.R., et al., *Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity.* Nature, 2005. **435**(7038): p. 98-104.
- 160. Lawson, N.D., A.M. Vogel, and B.M. Weinstein, *sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 127-36.
- 161. Moyon, D., et al., *Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo.* Development, 2001. **128**(17): p. 3359-70.
- Lavine, K.J. and D.M. Ornitz, *Rebuilding the coronary vasculature: hedgehog as a new candidate for pharmacologic revascularization*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(3): p. 77-83.
- 163. Kanda, S., et al., *Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase.* J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8244-9.
- 164. Augustin, H.G. and Y. Reiss, *EphB receptors and ephrinB ligands: regulators of vascular assembly and homeostasis.* Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 25-31.
- 165. Vokes, S.A., et al., *Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis.* Development, 2004. **131**(17): p. 4371-80.
- 166. Murone, M., A. Rosenthal, and F.J. de Sauvage, *Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates.* Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 25-33.
- 167. Carmeliet, P. and M. Tessier-Lavigne, *Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 193-200.
- 168. Larrivee, B., et al., *Guidance of vascular development: lessons from the nervous system*. Circ Res, 2009. **104**(4): p. 428-41.
- 169. Eichmann, A., T. Makinen, and K. Alitalo, *Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation*. Genes Dev, 2005. **19**(9): p. 1013-21.

- 170. Lu, X., et al., *The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 179-86.
- 171. Thurston, G., *Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis.* Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 61-8.
- 172. Suri, C., et al., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.* Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-80.
- 173. Wong, A.L., et al., *Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 567-74.
- 174. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.* Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
- 175. Murdoch, C., et al., *Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7405-11.
- 176. Hata, K., et al., *Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie2 genes in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer.* Oncology, 2002. **62**(4): p. 340-8.
- 177. Bartram, W.H.C.R., *Die Onkologie*. 2 ed. 2010: Springer Berlin Heidelberg. 824.
- 178. Warburg, O., Über die klassifizierung tierischer Gewebe nach ihrem Stoffwechsel. Biochem. Z., 1928. **184**: p. 484-488.
- Warburg, O., *The Chemical Constitution of Respiration Ferment*. Science, 1928.
 68(1767): p. 437-443.
- 180. Sandercoe, T.M., et al., *Astrocyte proliferation during development of the human retinal vasculature*. Exp Eye Res, 1999. **69**(5): p. 511-23.
- 181. Fruttiger, M., *Development of the Mouse Retinal Vasculature: Angiogenesis Versus Vasculogenesis.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002. **43**(2): p. 522-527.
- 182. Cogan, D.G. and T. Kuwabara, *Accessory cells in vessels of the paranatal human retina*. Arch Ophthalmol, 1986. **104**(5): p. 747-52.
- 183. Chan-Ling, T., et al., *Astrocyte-Endothelial Cell Relationships during Human Retinal Vascular Development*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2004. **45**(6): p. 2020-2032.
- 184. Chan-Ling, T.L., P. Halasz, and J. Stone, *Development of retinal vasculature in the cat: processes and mechanisms*. Curr Eye Res, 1990. **9**(5): p. 459-78.
- 185. Hughes, S., H. Yang, and T. Chan-Ling, *Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(5): p. 1217-28.
- 186. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.* Circ Res, 2004. **95**(4): p. 343-53.
- 187. Rehman, J., et al., Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. Circulation, 2003.
 107(8): p. 1164-9.
- 188. Otani, A., et al., *Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis.* Nat Med, 2002. **8**(9): p. 1004-10.
- 189. Chan-Ling, T., B. Gock, and J. Stone, *The effect of oxygen on vasoformative cell division*. *Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(7): p. 1201-14.
- Pierce, E.A., E.D. Foley, and L.E. Smith, *Regulation of vascular endothelial growth factor* by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(10): p. 1219-28.
- 191. West, H., W.D. Richardson, and M. Fruttiger, Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. Development, 2005. 132(8): p. 1855-62.
- 192. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.

- 193. Fruttiger, M., et al., *PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina*. Neuron, 1996. **17**(6): p. 1117-31.
- 194. Ling, T.L. and J. Stone, *The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve.* Brain Res Dev Brain Res, 1988. **44**(1): p. 73-85.
- 195. Schnitzer, J., *Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina*. Neurosci Lett, 1987. **78**(1): p. 29-34.
- 196. Fruttiger, M., *Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(2): p. 522-7.
- 197. Chu, Y., S. Hughes, and T. Chan-Ling, *Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma*. FASEB J, 2001. **15**(11): p. 2013-5.
- 198. West, H., W.D. Richardson, and M. Fruttiger, *Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes.* Development, 2005. **132**(8): p. 1855-1862.
- 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.
- 200. Gu, X., et al., *Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(3): p. C546-54.
- 201. Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet, *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. Development, 1998. **125**(9): p. 1591-8.
- 202. Ishida, S., et al., *Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 781-8.
- 203. Willam, C., et al., *Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H2044-52.
- 204. Springer, T.A., Adhesion receptors of the immune system. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
- 205. Valledor, A.F., et al., *Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation.* J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 405-17.
- 206. Johnston, R.B., Jr., *Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages.* N Engl J Med, 1988. **318**(12): p. 747-52.
- 207. Grage-Griebenow, E., H.D. Flad, and M. Ernst, *Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(1): p. 11-20.
- 208. Polverini, P.J., et al., *Activated macrophages induce vascular proliferation*. Nature, 1977. **269**(5631): p. 804-6.
- Lingen, M.W., Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. Arch Pathol Lab Med, 2001. 125(1): p. 67-71.
- 210. Sunderkotter, C., et al., *Macrophages and angiogenesis*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(3): p. 410-22.
- 211. Sunderkotter, C., et al., *Macrophage-derived angiogenesis factors*. Pharmacol Ther, 1991. **51**(2): p. 195-216.
- 212. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
- 213. Ribatti, D., et al., *Macrophages and tumor angiogenesis*. Leukemia, 2007. **21**(10): p. 2085-9.
- 214. Talks, K.L., et al., *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages.* Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 411-21.

- 215. Jensen, J.A., et al., *Effect of lactate, pyruvate, and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages.* Lab Invest, 1986. **54**(5): p. 574-8.
- 216. Knighton, D.R. and V.D. Fiegel, *Macrophage-derived growth factors in wound healing: regulation of growth factor production by the oxygen microenvironment.* Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(4): p. 1108-11.
- 217. Knighton, D.R., et al., *Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages.* Science, 1983. **221**(4617): p. 1283-5.
- 218. DiPietro, L.A., *Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells.* Shock, 1995. **4**(4): p. 233-40.
- 219. Bosco, M.C., et al., *Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration.* Immunobiology, 2008. **213**(9-10): p. 733-49.
- Fantin, A., et al., *Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction.* Blood, 2010.
 116(5): p. 829-40.
- 221. Checchin, D., et al., *Potential Role of Microglia in Retinal Blood Vessel Formation*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2006. **47**(8): p. 3595-3602.
- 222. Gehrmann, J. and G.W. Kreutzberg, *Monoclonal antibodies against* macrophages/microglia: immunocytochemical studies of early microglial activation in experimental neuropathology. Clin Neuropathol, 1993. **12**(5): p. 301-6.
- 223. Diaz-Araya, C.M., et al., *Development of microglial topography in human retina*. J Comp Neurol, 1995. **363**(1): p. 53-68.
- 224. Provis, J.M., C.M. Diaz, and P.L. Penfold, *Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies.* Perspect Dev Neurobiol, 1996. **3**(3): p. 213-22.
- 225. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.* Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.
- 226. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo.* Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-1318.
- 227. Pennell, N.A. and W.J. Streit, *Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization.* Cell Transplant, 1997. **6**(3): p. 221-30.
- 228. Lyons, S.A., et al., *Distinct physiologic properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion.* J Cereb Blood Flow Metab, 2000. **20**(11): p. 1537-49.
- 229. Lalancette-Hebert, M., et al., *Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain.* J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2596-605.
- 230. Flanders, K.C., R.F. Ren, and C.F. Lippa, *Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease*. Prog Neurobiol, 1998. **54**(1): p. 71-85.
- 231. Kluge, A., et al., [Thoracic real-time MRI: experience from 2200 examinations in acute and ill-defined thoracic diseases]. Rofo, 2005. **177**(11): p. 1513-21.
- 232. Shimojo, M., et al., *Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia*. Neurosci Lett, 1991. **123**(2): p. 229-31.
- 233. Liu, X., et al., Basic FGF and FGF receptor 1 are expressed in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis: temporally distinct expression of midkine and pleiotrophin. Glia, 1998. **24**(4): p. 390-7.
- 234. Nagai, A., et al., *Immortalized human microglial cell line: phenotypic expression*. J Neurosci Res, 2005. **81**(3): p. 342-8.
- 235. Nagai, A., et al., *Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines.* Neurobiol Dis, 2001. **8**(6): p. 1057-68.
- 236. Hume, D.A., V.H. Perry, and S. Gordon, *Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying*

neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. J Cell Biol, 1983. **97**(1): p. 253-7.

- 237. Penfold, P.L. and J.M. Provis, *Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1986. **224**(6): p. 549-53.
- 238. Checchin, D., et al., *Potential role of microglia in retinal blood vessel formation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(8): p. 3595-602.
- 239. Ritter, M.R., et al., *Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy.* J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3266-76.
- 240. Augustin, H.G., *Angiogenesis in the female reproductive system*. EXS, 2005(94): p. 35-52.
- 241. DPA. 275 Gramm der leichteste Knabe der Welt. Available from: <u>http://www.stern.de/gesundheit/fruehgeburt-in-goettingen-275-gramm-der-leichteste-knabe-der-welt-1548360.html</u>.
- 242. BBC. *Most-premature baby allowed home*. 2007; Available from: http://news.bbc.co.uk/2/hi/americas/6384621.stm.
- 243. Terry, T.L., Fibroblastic Overgrowth of Persistent Tunica Vasculosa Lentis in Infants Born Prematurely: II. Report of Cases-Clinical Aspects. Trans Am Ophthalmol Soc, 1942.
 40: p. 262-84.
- 244. Hatfield, E.M., *Blindness in infants and young children*. Sight Sav Rev, 1972. **42**(2): p. 69-89.
- 245. Jandeck, C., U. Kellner, and M.H. Foerster, *[Retinopathy of prematurity]*. Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde, 2004. **221**(3): p. 147-59.
- 246. Jandeck, C., et al., [Screening for retinopathy of prematurity: results of one centre between 1991 and 2002]. Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde, 2005. 222(7): p. 577-85.
- 247. Smith, L.E., et al., *Oxygen-induced retinopathy in the mouse*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1994. **35**(1): p. 101-111.
- 248. Alon, T., et al., *Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity.* Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1024-8.
- 249. Ishida, S., et al., *VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization.* The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(3): p. 483-9.
- 250. Chen, J. and L. Smith, *Retinopathy of prematurity*. Angiogenesis, 2007. **10**(2): p. 133-140.
- 251. Connor, K.M., et al., *Increased dietary intake of [omega]-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis.* Nat Med, 2007. **13**(7): p. 868-873.
- 252. Xie, X.W. and P. Zhao, [*The experimental study of captopril and valsartan on the preventing and treatment of diabetic retinopathy in diabetic mice*]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 2004. **40**(11): p. 770-3.
- 253. Hood, L., M. Kronenberg, and T. Hunkapiller, *T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family.* Cell, 1985. **40**(2): p. 225-9.
- Ruoslahti, E. and B. Obrink, *Common principles in cell adhesion*. Exp Cell Res, 1996.
 227(1): p. 1-11.
- 255. Amzel, L.M. and R.J. Poljak, *Three-dimensional structure of immunoglobulins*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 961-97.
- 256. Barclay, A.N., *Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules*. Semin Immunol, 2003. **15**(4): p. 215-23.

- 257. Doolittle, R.F., *Similar amino acid sequences revisited.* Trends Biochem Sci, 1989. **14**(7): p. 244-5.
- 258. Waterston, R.H., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.* Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
- 259. Gold, P. and S.O. Freedman, Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. The Journal of experimental medicine, 1965. 121: p. 439-62.
- Hammarstrom, S., The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. Semin Cancer Biol, 1999.
 9(2): p. 67-81.
- 261. Gardner, R.C., et al., Serial carcinoembryonic antigen (CEA) blood levels in patients with ulcerative colitis. Am J Dig Dis, 1978. **23**(2): p. 129-33.
- 262. Maziak, W., Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in hookah smokers, cigarette smokers and non-smokers-a comment. J Pak Med Assoc, 2008. **58**(3): p. 155.
- 263. Graham, R.A., et al., *Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray, and colonoscopy*. Ann Surg, 1998. **228**(1): p. 59-63.
- 264. Beauchemin, N., et al., *Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family*. Exp Cell Res, 1999. **252**(2): p. 243-9.
- 265. Demuth, J.P., et al., *The evolution of mammalian gene families*. PLoS ONE, 2006. **1**: p. e85.
- 266. Kammerer, R. and W. Zimmermann, *Coevolution of activating and inhibitory receptors* within mammalian carcinoembryonic antigen families. BMC Biol, 2010. **8**: p. 12.
- 267. Boulton, I.C. and S.D. Gray-Owen, *Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes.* Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 229-36.
- 268. Pils, S., et al., *CEACAM3: an innate immune receptor directed against human-restricted bacterial pathogens.* Int J Med Microbiol, 2008. **298**(7-8): p. 553-60.
- 269. Schmitter, T., et al., *Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens.* The Journal of experimental medicine, 2004. **199**(1): p. 35-46.
- 270. Teglund, S., et al., The pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene cluster on human chromosome 19: fine structure of the 11 PSG genes and identification of 6 new genes forming a third subgroup within the carcinoembryonic antigen (CEA) family. Genomics, 1994. 23(3): p. 669-84.
- Zebhauser, R., et al., Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. Genomics, 2005. 86(5): p. 566-80.
- 272. Nedellec, P., et al., *Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses.* J Virol, 1994. **68**(7): p. 4525-37.
- 273. Zhou, G.Q., Y. Zhang, and S. Hammarstrom, *The carcinoembryonic antigen (CEA) gene family in non-human primates.* Gene, 2001. **264**(1): p. 105-12.
- 274. Zimmermann, CEA Homepage. 2008.
- 275. Svenberg, T., S. Hammarstrom, and A. Hedin, *Purification and properties of biliary glycoprotein I (BGP I). Immunochemical relationship to carcinoembryonic antigen.* Mol Immunol, 1979. **16**(4): p. 245-52.
- 276. Svenberg, T., *Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization.* Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 588-96.

- 277. Ocklind, C. and B. Obrink, *Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process.* J Biol Chem, 1982.
 257(12): p. 6788-95.
- 278. Obrink, B., *CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(5): p. 616-26.
- 279. Prall, F., et al., *CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues.* J Histochem Cytochem, 1996. **44**(1): p. 35-41.
- 280. Horst, A.a.W., C., *CEA-related CAMs*, in *Handbook of experimental pharmacology*. 2004, Springer: New York.
- 281. Coutelier, J.P., et al., *B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus.* Eur J Immunol, 1994. **24**(6): p. 1383-90.
- 282. Kammerer, R., et al., *Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation.* Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3664-74.
- 283. Muller, M.M., et al., *Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src.* J Cell Biol, 2009. **187**(4): p. 569-81.
- 284. Klaile, E., et al., *The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters.* J Cell Biol, 2009. **187**(4): p. 553-67.
- 285. <u>http://www.carcinoembryonic-antigen.de/</u>. Available from: <u>http://www.carcinoembryonic-antigen.de/</u>.
- 286. Gray-Owen, S.D. and R.S. Blumberg, *CEACAM1: contact-dependent control of immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 433-446.
- 287. Singer, B.B., I. Scheffrahn, and B. Obrink, *The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation.* Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1236-44.
- 288. Poy, M.N., et al., *Shc and CEACAM1 interact to regulate the mitogenic action of insulin*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1076-84.
- 289. Morales, V.M., et al., *Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a).* J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1363-70.
- 290. Kleinerman, D.I., et al., *Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor.* Cancer Res, 1995. **55**(6): p. 1215-20.
- 291. Huang, J., et al., *Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F.* J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 23)**: p. 4193-205.
- 292. Donda, A., et al., *Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response*. Eur J Immunol, 2000. **30**(9): p. 2593-603.
- 293. Bamberger, A.M., et al., *The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast.* Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1165-70.
- 294. Thies, A., et al., *CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease.* J Clin Oncol, 2002. **20**(10): p. 2530-6.
- 295. Wang, L., et al., *C-CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2000. **6**(8): p. 2988-93.
- 296. 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.

- 297. Horst, A.K., et al., *CEACAM1+ myeloid cells control angiogenesis in inflammation*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6726-36.
- 298. 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.
- 299. 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.
- 300. Gray-Owen, S.D. and R.S. Blumberg, *CEACAM1: contact-dependent control of immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 433-46.
- 301. Greicius, G., et al., *CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation.* J Leukoc Biol, 2003. **74**(1): p. 126-34.
- 302. Kammerer, R., et al., Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. J Immunol, 2001.
 166(11): p. 6537-44.
- 303. Skubitz, K.M., K.D. Campbell, and A.P. Skubitz, *CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils.* J Leukoc Biol, 1996. **60**(1): p. 106-17.
- 304. Singer, B.B., et al., *CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligandinduced apoptosis in granulocytes.* Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1949-59.
- 305. Najjar, S.M., *Regulation of insulin action by CEACAM1*. Trends Endocrinol Metab, 2002.
 13(6): p. 240-5.
- 306. Billker, O., et al., *The structural basis of CEACAM-receptor targeting by neisserial Opa proteins*. Trends Microbiol, 2000. **8**(6): p. 258-60; discussion 260-1.
- 307. Ramakrishna, C., et al., *Expression of the mouse hepatitis virus receptor by central nervous system microglia*. J Virol, 2004. **78**(14): p. 7828-32.
- 308. Cruz, P.V., et al., Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression is an adverse prognostic factor in hepatocellular carcinoma. Cancer, 2005.
 104(2): p. 354-60.
- 309. Wagener, C. and S. Ergun, *Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen*related cell adhesion molecule 1. Exp Cell Res, 2000. **261**(1): p. 19-24.
- 310. Chen, C.J., et al., *Mutation analysis of the short cytoplasmic domain of the cell-cell adhesion molecule CEACAM1 identifies residues that orchestrate actin binding and lumen formation.* J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5749-60.
- 311. Volpert, O., et al., *Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35696-702.
- 312. Schaefer, B.C., et al., *Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo.* Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 110-22.
- 313. Connor, K.M., et al., Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. Nat Protoc, 2009.
 4(11): p. 1565-73.
- 314. Friedlander, M., et al., *Progenitor cells and retinal angiogenesis*. Angiogenesis, 2007. **10**(2): p. 89-101.
- 315. Ito, D., et al., *Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.* Brain Res Mol Brain Res, 1998. **57**(1): p. 1-9.
- 316. Imai, Y. and S. Kohsaka, *Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1*. Glia, 2002. **40**(2): p. 164-74.
- 317. Grunewald, M., et al., *VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells.* Cell, 2006. **124**(1): p. 175-89.
- 318. Dorrell, M.I., et al., Adult bone marrow-derived stem cells use R-cadherin to target sites of neovascularization in the developing retina. Blood, 2004. **103**(9): p. 3420-3427.

- 319. Avery, R.L., et al., *Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy*. Ophthalmology, 2006. **113**(10): p. 1695 e1-15.
- 320. Al-Latayfeh, M., et al., *Antiangiogenic therapy for ischemic retinopathies*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(6): p. a006411.
- 321. Mancuso, M.R., et al., *Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition.* J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2610-21.
- 322. Hemmila, E., et al., *Ceacam1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59.* J Virol, 2004. **78**(18): p. 10156-65.
- 323. Jackson, D.E., K.R. Kupcho, and P.J. Newman, *Characterization of phosphotyrosine* binding motifs in the cytoplasmic domain of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (*PECAM-1*) that are required for the cellular association and activation of the protein-tyrosine phosphatase, *SHP-2.* J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 24868-75.
- 324. Jackson, D.E., et al., *The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrinmediated cellular signaling.* J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6986-93.
- 325. Biswas, P., et al., *PECAM-1 promotes beta-catenin accumulation and stimulates* endothelial cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(1): p. 212-8.
- 326. Koichi Uno, C.A.M.R.G.G.A.L.T.W.P., *Hyperoxia inhibits several critical aspects of vascular development.* Developmental Dynamics, 2007. **236**(4): p. 981-990.
- 327. Stuhr, L.E., et al., *Hyperoxia retards growth and induces apoptosis, changes in vascular density and gene expression in transplanted gliomas in nude rats.* J Neurooncol, 2007.
 85(2): p. 191-202.
- 328. Nouvion, A.L., et al., *CEACAM1: a key regulator of vascular permeability.* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4221-30.
- 329. Edgar, K., et al., *eNOS overexpression exacerbates vascular closure in the obliterative phase of OIR and increases angiogenic drive in the subsequent proliferative stage.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(11): p. 6833-50.
- 330. Kilic, N., et al., *Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2361-9.
- 331. Sims, D.E., *The pericyte--a review*. Tissue Cell, 1986. **18**(2): p. 153-74.
- 332. Cogan, D.G., D. Toussaint, and T. Kuwabara, *Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy.* Arch Ophthalmol, 1961. **66**: p. 366-78.
- 333. Motiejunaite, R. and A. Kazlauskas, *Pericytes and ocular diseases*. Exp Eye Res, 2008. **86**(2): p. 171-7.
- 334. Hammes, H.P., et al., *Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3107-12.
- 335. Allt, G. and J.G. Lawrenson, *Pericytes: cell biology and pathology*. Cells Tissues Organs, 2001. **169**(1): p. 1-11.
- 336. Hughes, S., et al., *Changes in pericytes and smooth muscle cells in the kitten model of retinopathy of prematurity: implications for plus disease.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(3): p. 1368-79.
- 337. Stitt, A.W., et al., *Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats.* Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 523-31.
- 338. Klinghoffer, R.A., et al., *The two PDGF receptors maintain conserved signaling in vivo despite divergent embryological functions.* Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 343-54.
- 339. Sawa, H., et al., *C-CAM expression in the developing rat central nervous system.* Brain Res Dev Brain Res, 1994. **78**(1): p. 35-43.

- 340. Gerstel, D., et al., *CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation.* Oncogene, 2011. **30**(41): p. 4275-88.
- 341. Markel, G., et al., *Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions.* J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 943-53.
- 342. Nakajima, A., et al., Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. J Immunol, 2002. 168(3): p. 1028-35.
- 343. Chen, D., et al., Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 isoforms alternatively inhibit and costimulate human T cell function. J Immunol, 2004.
 172(6): p. 3535-43.
- 344. Nagaishi, T., et al., *SHP1 phosphatase-dependent T cell inhibition by CEACAM1 adhesion molecule isoforms.* Immunity, 2006. **25**(5): p. 769-81.
- 345. Nagaishi, T., et al., *CEACAM1 and the regulation of mucosal inflammation*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S39-42.
- 346. Bernhard B. Singer, E.K.I.S.Mario M.M.R.K.W.R.B.Ö.L.L., *CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes*. European Journal of Immunology, 2005. **35**(6): p. 1949-1959.
- 347. Wang, S., C.M. Sorenson, and N. Sheibani, *Attenuation of retinal vascular development and neovascularization during oxygen-induced ischemic retinopathy in Bcl-2-/- mice.* Dev Biol, 2005. **279**(1): p. 205-19.
- Yu, Q., et al., CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. J Biol Chem, 2006.
 281(51): p. 39179-93.
- 349. Chen, W.J., et al., *Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1.* Shock, 2005. **24**(2): p. 124-31.
- 350. Takahashi, H., et al., *Differential regulation of carcinoembryonic antigen and biliary glycoprotein by gamma-interferon.* Cancer Res, 1993. **53**(7): p. 1612-9.
- 351. Yang, L., et al., *Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumorbearing host directly promotes tumor angiogenesis.* Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 409-21.
- 352. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 71-8.
- 353. De Palma, M., et al., *Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 211-26.
- 354. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-44.
- 355. 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.
- 356. Schumann, D., et al., Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. J Biol Chem, 2001.
 276(50): p. 47421-33.
- 357. Ebrahimnejad, A., et al., *CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells.* Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1781-7.

9 Publikationsliste

Folgende Veröffentlichungen sind im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden:

- 1. **Ludewig P**, Flachsbarth K, Wegscheid C, Tiegs G, Richard G, Wagener C, Bartsch U, Horst AK. Ceacam1 confers resistance toward oxygen-induced vessel damage in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:7950-7960
- Bickert T, Marshall RP, Zhang Z, Ludewig P, Binder M, Klinke A, Rottbauer W, Amling M, Wagener C, Ito WD, Horst AK. Acceleration of collateral development by ceacam1 expression on cd11b+/gr-1+ myeloid cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012
- Gerstel D, Wegwitz F, Jannasch K, Ludewig P, Scheike K, Alves F, Beauchemin N, Deppert W, Wagener C, Horst AK. Ceacam1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation. *Oncogene*. 2011;30:4275-4288
- Horst AK, Bickert T, Brewig N, Ludewig P, van Rooijen N, Schumacher U, Beauchemin N, Ito WD, Fleischer B, Wagener C, Ritter U. Ceacam1+ myeloid cells control angiogenesis in inflammation. *Blood*. 2009;113:6726-6736

10 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Nach der mündlichen Prüfung im Fach "Klinische Chemie" (Präparat CML, Stichwort Sternenhimmel und bcr-abl) ließ Herr Professor Wagener über sein Sekretariat (Danke Frau Kroker!) anfragen, ob ich Interesse an einer Doktorarbeit in seinem Institut hätte. Hatte ich, und nach ein paar Umwegen über Fucosyltransferasen entstand diese Doktorarbeit. Ich danke Ihnen sehr, Herr Prof. Wagener, mir diese Doktorarbeit ermöglicht zu haben, durch die ich zum ersten Mal richtig mit wissenschaftlichen Arbeiten und Grundlagenwissenschaften in Berührung kam, und bis jetzt mit großer Freude geblieben bin.

Neben einemgroßen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen hatte Prof. Wagener auch einen tolles Team an Mitarbeitern unter seinen Fittichen. Neben Frau Frenz und Frau Scheike, die mich in diverse Techniken einführten, ist besonders Frau PD Dr. Andrea Horst zu erwähnen, die mich mit ihrem fundiertem biochemischen Wissen extrem gut betreute, rund um die Uhr zu erreichen war, immer ein offenes Ohr hatte und viel Verständnis aufbrachte, gerade in Phasen in denen Mal wieder die Sauerstoffkammer streikte. Als medizinischer Doktorand konnte ich mich sehr glücklich schätzen. Zusätzlich beeindruckte Frau PD Dr. Horst durch eine unglaubliche Resistenz gegen Capsaicin p.o., die seinesgleichen sucht.

Trotz seiner Affinität zu bajuwarischem Fußball und nikotinergen Stoffwechselwegen, war es mir immer eine große Freude Prof. Bartsch in seinem Reich zu besuchen, der mich von ophthalmologischer Seite betreute und auf vielen Gebieten über ein enormes Wissen und Erfahrung verfügt, mit einer ordentlichen Portion Skepsis, die mich manchmal gerechterweise auf den Boden der wissenschaftlichen Tatsachen zurückholte. Die Gespräche und Diskussionen, trotz des sehr milden Kaffees, haben sehr viel Spaß gemacht.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mich nicht nur während des Studiums und der Doktorarbeit, sondern vom Einzelzellstadium an bis heute sehr gut und aufopfernd betreut haben und mir immer große Vorbilder sein werden. Danke, Eri(ka) und Klaus !!!

Und Elke und Evi, Ihr seid die besten Schwestern, die man sich wünschen kann.

11 Lebenslauf

Der Lebenslauf in der Veröffentlichung der Dissertation entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12.Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: