

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde I

**CEACAM1-Expressionsanalysen sowie die Korrelation mit dem  
Wnt- und TLR-Signalweg:  
Untersuchungen basierend auf einem Tiermodell der  
Frühgeborenen-Hirnschädigung**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Burcin Dogan, geb. Ceylan  
aus Wuppertal  
(2022)

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/76982

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20221124-095801-7



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. U. Felderhoff-Müser

2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. S. Endesfelder

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2022

## **EIGENE PUBLIKATION**

Prager, S., Singer, B. B., Bendix, I., Schlager, G. W., Bertling, F., Ceylan, B., Keller, M., Felderhoff-Mueser, U. and Ergün, S. (2013) '*CEACAM1 expression in oligodendrocytes of the developing rat brain shows a spatiotemporal relation to myelination and is altered in a model of encephalopathy of prematurity*', *Developmental neuroscience*, vol. 35, 2-3, pp. 226–240

## **POSTERPRÄSENTATION**

Forschungstag Universitätsklinikum Essen, Essen (2012)

Ceylan B., Prager S., Singer BB, Felderhoff-Müser U.

*Coincidence of CEACAM1 expression and myelination in the developing rat brain*

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
2.1	DEFINITION, RELEVANZ UND URSACHEN DER FRÜHGEBURTlichkeit	8
2.2	FOLGEN DER FRÜHGEBURTlichkeit	9
2.3	PATHOGENESE DER ENCEPHALOPATHIE DES FRÜHGEBORENEN	11
2.3.1	<i>Schädigungsmuster</i>	11
2.3.2	<i>Noxen/Schädigungsmechanismen/Myelinisierung</i>	13
2.3.2.1	Hyperoxie	13
2.3.2.2	Infektion und Inflammation	13
2.3.2.3	Zerebrale Hypoxie/Ischämie	14
2.4	CEACAM1	14
2.4.1	<i>Struktur und Expression</i>	15
2.4.2	<i>CEACAM1: Ein multifunktionales Signalprotein</i>	16
2.4.2.1	Zelladhäsion	16
2.4.2.2	Zelldifferenzierung und Zellproliferation	16
2.4.2.3	Immunmodulation	17
2.4.3	<i>CEACAM1 im sich entwickelnden Gehirn der Ratte</i>	17
2.5	WNT UND TLR	19
2.5.1	<i>Wnt-Signalweg</i>	19
2.5.2	<i>TLR2- und TLR4-Signalweg</i>	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
3.1	MATERIAL	25
3.1.1	<i>Versuchstiere</i>	25
3.1.2	<i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i>	25
3.1.2.1	Histologie	25
3.1.2.2	Molekularbiologie	26
3.1.2.3	Zellbiologie	27
3.1.2.4	Chemikalien und Pharmaka	27
3.1.2.5	Puffer und Lösungen	29
3.1.2.6	Medien für die Zellkultur	29
3.1.2.7	Antikörper	30
3.1.2.8	Primer	31
3.2	EXPERIMENTELLES DESIGN	32
3.3	HISTOLOGISCHE METHODEN	34
3.3.1	<i>Aufarbeitung der Hirne</i>	34
3.3.2	<i>Paraffineinbettung</i>	34

3.3.3	<i>Anfertigung der Paraffinschnitte</i> .....	35
3.3.4	<i>Immunhistochemisches Protokoll für CEACAM-1 und MBP</i> .....	35
3.4	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b> .....	37
3.4.1	<i>Präparation der Hirnregionen</i> .....	37
3.4.2	<i>RNA-Isolation</i> .....	38
3.4.3	<i>RNA-Konzentrationsbestimmung</i> .....	39
3.4.4	<i>PCR</i> .....	40
3.4.5	<i>Reverse Transkription der RNA</i> .....	40
3.4.6	<i>Realtime PCR</i> .....	42
3.4.6.1	<i>Effizienztestung der Primer</i> .....	43
3.4.6.2	<i>Durchführung der Real Time PCR</i> .....	44
3.5	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b> .....	46
3.5.1	<i>Anlegen und Kultivierung einer Glia-Mischkultur</i> .....	46
3.5.2	<i>Isolierung der Oligodendrozyten</i> .....	46
3.5.3	<i>Herstellung Poly-L-Ornithin beschichteter Platten</i> .....	47
3.5.4	<i>Kultivierung der Zellen</i> .....	47
3.5.5	<i>Subkultivierung der Zellen</i> .....	47
3.5.6	<i>Immunzytochemisches Protokoll für CEACAM-1, MBP, O1 und O4</i> .....	48
3.6	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b> .....	49
3.7	<b>BILDBEARBEITUNGSSOFTWARE</b> .....	50
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>51</b>
4.1	<b>KOLOKALISATION VON CEACAM1 MIT MYELINISIERENDEN STRUKTUREN AN P11</b> .....	51
4.2	<b>EXPRESSION DES CEACAM1 AUF PRIMÄREN OLIGODENDROZYTENKULTUREN</b> .....	54
4.3	<b>VERÄNDERUNG DER DNA-EXPRESSION VON CEACAM1, DES WNT- UND TLR2/4-SIGNALWEGS NACH SCHADEN</b> .....	56
4.3.1	<i>CEACAM1-Expression</i> .....	56
4.3.2	<i>Wnt-Signalweg: Axin2 und beta-Catenin</i> .....	61
4.3.3	<i>TLR2/4-Signalweg: MyD88, Ticam2 und Traf6</i> .....	63
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>65</b>
5.1	<b>EXPERIMENTELLES DESIGN</b> .....	66
5.2	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b> .....	67
5.3	<b>HISTOLOGIE</b> .....	67
5.4	<b>ZELLKULTUREN</b> .....	68
5.5	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ERGEBNISSE</b> .....	69
5.5.1	<i>CEACAM1</i> .....	69
5.5.2	<i>Wnt-Signalweg</i> .....	70
5.5.3	<i>TLR2/4-Signalweg</i> .....	71

5.6	BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE.....	72
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>85</b>
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	85
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	88
8.3	TABELLENVERZEICHNIS .....	89
8.4	TABELLEN/WERTE ZUR GENANALYSE.....	90
8.5	DANKSAGUNG.....	97
8.6	LEBENS LAUF .....	98

## 2 EINLEITUNG

---

Weltweit werden jährlich etwa 15 Millionen Kinder mit einem Gestationsalter < 37 SSW geboren und gelten somit per definitionem als Frühgeborene. In Deutschland wurden im Jahr 2020 nach Angaben des Instituts für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen von etwa 760.000 geborenen Kindern ungefähr 8 Prozent vor der 37. SSW geboren.

Durch den stetigen Zuwachs an Frühgeborenen sowie die Behandlung immer unreiferer Kinder in den letzten 15 Jahren steht die neonatologische Intensivmedizin vor neuen Herausforderungen und Anforderungen, da die Unreife der Kinder mit zahlreichen Morbiditäten und Einschränkungen verbunden ist.

Klinisch steigt mit sinkendem Gestationsalter das Risiko, Erkrankungen wie nekrotisierende Enterokolitis (NEK), early-onset und late-onset Sepsis, Retinopathia praematurorum (ROP), bronchopulmonale Dysplasie (BPD), intrakranielle Hämorrhagien und periventrikuläre Leukomalazie (PVL) zu entwickeln. Dabei ist vor allem die Schädigung des unreifen Gehirns mit langfristigen persönlichen und sozioökonomischen Konsequenzen verbunden.

Gegenwärtig sind die therapeutischen Optionen zur Vermeidung der Hirnschädigung bei Frühgeborenen begrenzt, zumal das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge noch große Lücken aufweist. Bekannt ist, dass das unreife Gehirn durch Noxen wie Medikamente, Hyper- und Hypoxie, intrauterine und postnatale Infektionen und Inflammation geschädigt wird. In der Folge kommt es unter anderem zum Untergang von Oligodendrozytenvorläuferzellen sowie zu einer Hemmung der Oligodendrozytenreifung und Myelinbildung. Dies resultiert in einer Minderentwicklung der weißen Substanz.

Bisher wurde gezeigt, dass die Expression von CEACAM1 mit der Myelinisierung der weißen Substanz korreliert. Nach hyperoxie- oder inflammations-induziertem Schaden ist neben der Beeinträchtigung der Myelinisierung auch die Expression von CEACAM1 verändert.

Über welche Signalwege dies erfolgt, ist bislang noch unklar. Ziel dieser Arbeit ist es, die Relevanz ausgewählter Signalwege zu ermitteln, über die CEACAM1 möglicherweise mit der Myelinisierung interagiert.

## **2.1 DEFINITION, RELEVANZ UND URSACHEN DER FRÜHGEBURTlichkeit**

Die Perinatalperiode erstreckt sich von der 22. SSW bis zum 7. Tag nach der Geburt. Alle Geburten unterhalb der abgeschlossenen 37. SSW sind definitionsgemäß Frühgeburten. Systematisch gegliedert werden kann die Frühgeburten entsprechend des Gestationsalters (Tucker and McGuire 2004):

34. -<37. SSW späte Frühgeburt

32. -<34. SSW moderate Frühgeburt

28. -<32. SSW frühe Frühgeburt

<28. SSW extreme Frühgeburt

Eine zweite Unterteilung erfolgt in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht (Tucker and McGuire 2004):

Niedriges Geburtsgewicht (LBW) <2500g

Sehr niedriges Geburtsgewicht (VLBW) <1500g

Extrem niedriges Geburtsgewicht (ELWB) <1000g

Beide Einteilungen stehen nicht zwangsläufig in unmittelbarer Korrelation zueinander; Frühgeburten kann zu einem niedrigen Geburtsgewicht führen, ein niedriges Geburtsgewicht muss allerdings nicht durch Frühgeburten bedingt sein.

Frühgeburten steht auf Platz zwei der häufigsten Ursachen für Kindestod unter dem Alter von 5 Jahren und auf Platz eins der wichtigsten direkten Gründe für Tod im ersten Lebensmonat (Howson et al., 2013) .

Innerhalb Europas schwankte die Frühgeborenenrate zwischen 5,5-11,1% (Zeitlin et al., 2013). Nach aktuelleren Daten liegt der europäischen Median bei 7,3% (Euro-Peristat Project 2018).

In den USA werden 10,2% der Neugeborenen unter der 37. SSW geboren, das entspricht, bei etwa 3,75 Millionen Geburten pro Jahr, ungefähr 382.000 Frühgeborenen (Martin et al., 2021).

In Ländern mit niedrigem Bruttonationaleinkommen ist die Frühgeborenenrate durchschnittlich am höchsten, während in vielen Ländern mit hoher Lebenserwartung und hohem *Human Development Index* wiederum aufgrund zunehmender reproduktionsmedizinischer Behandlungen ein Anstieg an Frühgeburten beobachtet wird (Chang et al., 2013).

Die zur Frühgeburtlichkeit führenden Ursachen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: maternale und externe Faktoren. Zu den maternalen Faktoren werden das Alter, die Anzahl der Schwangerschaften, Genetik, Ernährung und Psyche zugeordnet. Viele dieser Faktoren sind schwierig zu beeinflussen. Externe Faktoren umfassen beispielsweise geburtsmedizinische Aspekte, Umweltfaktoren und Infektionen (Blencowe et al., 2013). Insbesondere Infektionen sind von Interesse, da sie nicht nur eine Ursache der Frühgeburtlichkeit sind, sondern auch die neurologische Entwicklung des Kindes beeinflussen können (Hagberg et al., 2015).

## 2.2 FOLGEN DER FRÜHGEBURTlichkeit

Die Neonatalperiode ist eine Hochrisikophase, die durch eine hohe Morbidität und Mortalität geprägt ist. In dieser Lebensphase ist der Organismus während komplexer Prozesse wie der Organo- und Neurogenese besonders verwundbar.

Dem Fortschritt in der neonatalen Intensivmedizin ist zu verdanken, dass über 90% der Säuglinge mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht diesen Abschnitt überleben (Deutsches Frühgeborenen Netzwerk, Bericht 2016; IQTIG, Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2020, Neonatologie). Mit abnehmendem Gestationsalter und Geburtsgewicht nehmen die Risiken für Mortalität und Morbidität zu.

Durch die Unreife tragen Frühgeborene ein deutlich höheres Risiko für frühgeborenen-spezifische Erkrankungen folgender Organe:

Herz: Der Ductus arteriosus botalli ist eine Gefäßverbindung zwischen der Aorta und dem Truncus pulmonalis, die für die fetale Blutzirkulation unabdingbar ist und physiologisch

nach der Geburt obliteriert. Frühgeburtlichkeit kann diesen Prozess verhindern, sodass ein *Persistierender Ductus Arteriosus* (PDA) resultiert. Langfristig führt dies zu einer linksventrikulären Volumenbelastung mit einer Linksherzhypertrophie, pulmonalen Hypertonie und Herzinsuffizienz.

Lunge: Die reduzierte Produktion von Surfactant resultiert in einem Alveolenkollaps, welcher zum Bild eines *Respiratory Distress Syndrome* (RDS) führt. Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wurde lange als Folge eines RDS und mechanischer Beatmung/Sauerstofftherapie gesehen. Dahingegen zeigen sich bei der „neuen“ BPD Störungen in der Lungenreifung mit verminderter Anzahl an Alveolen und gestörter Gefäßstruktur, die durch Faktoren wie Frühgeburtlichkeit, Sauerstofftherapie, mechanische Beatmung, Infektionen, PDA und genetische Aspekte beeinflusst werden. 2020 betrug der Anteil an Frühgeborenen mit moderater bis schwerer BPD zwischen der 22. bis 32. SSW knapp 7%. (IQTIG, Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2020, Neonatologie).

Darm: Die *nekrotisierende Enterokolitis* (NEK) ist eine vor allem bei Frühgeborenen multifaktoriell-bedingt auftretende Erkrankung des Darmes mit Schädigung der Darmwand (Choi 2014), die sich in unterschiedlichen Schweregraden äußert. Therapieoptionen werden in symptomatische und chirurgische Maßnahmen unterteilt (AWMF-Leinlinie Nekrotisierende Enterokolitis (NEK)). Der größte Anteil an von einer NEK betroffenen Frühgeborenen befindet sich mit knapp 9% in der 23. SSW (IQTIG, Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2020, Neonatologie).

ROP: Die *Retinopathie des Frühgeborenen* (ROP) entsteht durch eine gestörte Vaskularisation der Netzhaut mit Proliferation neuer Blutgefäße in das Corpus vitreum. Letztendlich kann dies zur Ablösung der Retina und bis zur Erblindung führen (Lee and Dammann 2012).

Hörstörungen: Frühgeborene haben ein höheres Risiko für auditive Einschränkungen. So können bis zu ca. 3% der Frühgeborenen <28 SSW Hördefizite entwickeln (Arpino et al., 2010).

Gehirn: Hinsichtlich der Langzeit-Morbidität nimmt das Gehirn eine besonders wichtige Rolle ein. Frühgeburtlichkeit hat einen großen Einfluss auf die Hirnentwicklung und erhöht das Risiko neonataler Hirnschädigung wie das Entstehen von intrakraniellen Hämorrhagien (ICH) und periventrikulärer Leukomalazie (PVL). Es treten sowohl kognitive als auch motorische und psychiatrische Funktionsstörungen auf. Kognitive

Einschränkungen lassen sich durch kognitive Entwicklungstestungen erfassen. Im Jahr 2016 belief sich der Anteil der Frühgeborenen mit einem IQ <85 auf 19,1% und mit einem IQ <70 auf 5,9% (Deutsches Frühgeborenen Netzwerk, Bericht 2016).

Motorische Einschränkungen wie die *Zerebralparese*, die meist durch eine ICH oder PVL hervorgerufen wird, treten bei etwa 10% der Frühgeborenen <28 SSW auf (Doyle et al., 2010). Mit einer Häufigkeit von 25-50% kommen psychiatrische Beeinträchtigungen wie Konzentrationsschwierigkeiten und andere soziale Verhaltensauffälligkeiten vor, die sich klinisch beispielsweise durch ein Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivität-Syndrom (ADHS) darstellen können (Volpe 2009b).

## **2.3 PATHOGENESE DER ENCEPHALOPATHIE DES FRÜHGEBORENEN**

### **2.3.1 SCHÄDIGUNGSMUSTER**

Für die komplexen strukturellen Schädigungen des Gehirns im Rahmen der Frühgeburtlichkeit wurde der Begriff „Encephalopathie des Frühgeborenen“ („encephalopathy of prematurity“) eingeführt (Volpe 2009a). Zur *Encephalopathie des Frühgeborenen* zählen die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) sowie die Schädigung axonaler beziehungsweise neuronaler Strukturen.

Die PVL umfasst die Schädigung weißer Substanz, die durch Astrozyto- und Mikrozytogliose sowie die Abnahme myelin-produzierender Oligodendrozyten bei zunehmender Anzahl der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) gekennzeichnet ist. Letzteres wird als kompensatorischer Reparaturmechanismus des durch die PVL bedingten Verlusts unreifer Oligodendrozyten gesehen (Volpe 2009b).

Zwischen der 24.-40. SSW tragen OPC eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Gehirns, da sie für die schnelle Entwicklung und Differenzierung des menschlichen Hirns verantwortlich sind. Sie entwickeln sich weiter zu Myelin-produzierenden Oligodendrozyten (Volpe 2009b, 2012). Durch Schädigung weißer Substanz fehlt den OPC jedoch die vollständige Fähigkeit zur Differenzierung und Myelinisierung, wodurch eine Hypomyelinisierung resultiert (Billiards et al., 2008; Volpe 2009b).

Etwa 50% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g (VLBW) zeigen Anzeichen für eine PVL (Volpe 2009a, 2009b). Schädigungsmuster bei der PVL können als fokale, makroskopisch erkennbare, bis einige Millimeter messende Läsionen auftreten, die

sich im Verlauf zu Zysten formieren. Diese Form lässt sich im Schädelultraschall als zystische PVL sichtbar darstellen. Treten die Läsionen als mikroskopische Veränderungen auf, die sich zu Narben entwickeln, sind sie in der Bildgebung schwer nachzuweisen. Durch den Einsatz von cMRT kann die nicht-zystische PVL mittlerweile besser visualisiert werden. Die nicht-zystische PVL tritt häufiger als die zystische PVL auf (Volpe 2009a) und geht öfter mit erweiterten Seitenventrikeln einher (Inder et al., 2005).

Im Gegensatz zur PVL beschreibt die Schädigung neuronaler/axonaler Strukturen das Volumendefizit der grauen Substanz durch Neuronenverlust in Cortex, Thalamus, Basalganglien und im Cerebellum (Volpe 2009a).

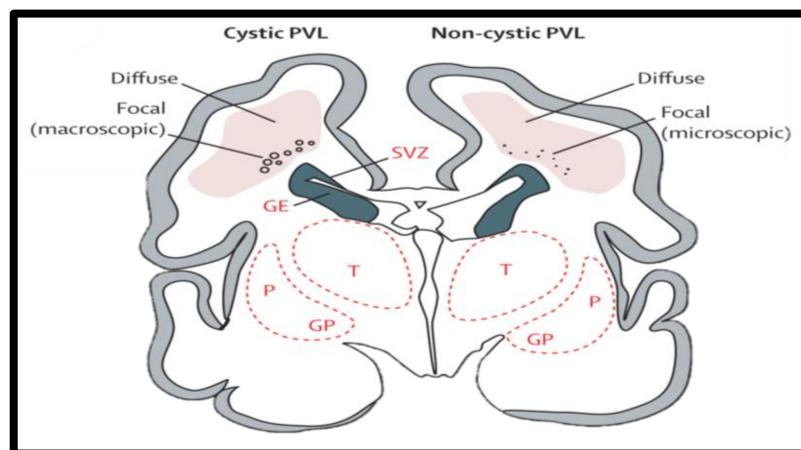


Abbildung 1: Zystische und nicht-zystische PVL (aus J.J. Volpe, 2009a)

Zwischen der 24.-40. SSW nehmen subplate Neurone, eine transiente Population unterhalb der kortikalen Platte, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Cortex ein. Es handelt sich um eine großteils transiente Population von Neuronen, die während der Hirnentwicklung für die Ausbildung von Synapsen und Ausreifung neuronaler Strukturen verantwortlich sind. Subplate Neurone sind in diesem Zeitraum besonders vulnerabel bei Schädigung. Dadurch, dass die den größten Teil an neuronalen Zellen einnehmen und die Verbindung zwischen Cortex und Thalamus herstellen, resultiert bei Schädigung ein deutlicher Volumenverlust (Volpe 2009b). Dieser Volumenverlust bleibt irreversibel. Es können sich Volumendefizite bis zu 1/3 in der weißen und bis zu 1/5 in der grauen Substanz bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen ergeben (Inder et al., 2005).

## 2.3.2 NOXEN/SCHÄDIGUNGSMECHANISMEN/MYELINISIERUNG

Multiple Faktoren führen zur PVL. Noxen wie Hyperoxie, Infektion und Inflammation, zerebrale Hypoxie, Ischämie und Exzitotoxizität beeinträchtigen die neonatale Hirnentwicklung. Im Folgenden werden vier Auslöser der PVL genauer beschrieben:

### 2.3.2.1 HYPEROXIE

In klinischen Studien konnte der schädigende Effekt von Hyperoxie auf das Gehirn gezeigt werden (Back and Miller 2014; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Gerstner et al., 2008). Intrauterin unterliegt ein Fetus während der Entwicklung hypoxischen Konditionen (pO<sub>2</sub> von etwa 25 mmHg). Postnatal steigt der Sauerstoffpartialdruck auf 60-80 mmHg pO<sub>2</sub> an, dies entspricht dem dreifachen Wert der intrauterinen Verhältnisse, sodass ein Neugeborenes einem relativen Sauerstoffstress unterliegt (Kwak et al., 2006). Zusätzliche Sauerstoffgabe beeinträchtigt die Entwicklung des neonatalen Gehirns. So konnte tierexperimentell in Nagern gezeigt werden, dass zusätzliche Sauerstoffgabe zur neuronalen Schädigung der grauen und weißen Substanz führt (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Hyperoxie führt über einen Anstieg von Caspase-1 und den proinflammatorischen Interleukinen Il-1 $\beta$  und Il-18 zur Apoptose und Inflammation (Felderhoff-Mueser et al., 2005), insbesondere von unreifen Oligodendrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Gerstner et al., 2008). Durch die geschädigten unreifen Oligodendrozyten resultiert als Folge eine veränderte Myelinbildung (Gerstner et al., 2008; Schmitz et al., 2011).

### 2.3.2.2 INFEKTION UND INFLAMMATION

Inflammation gilt nicht nur als Trigger der Frühgeburtlichkeit, sondern auch als Auslöser der Encephalopathie des Frühgeborenen. In der vulnerablen Phase der Entwicklung des unreifen Gehirns führt die Inflammation zu einer Störung der Myelinisierung sowie zur Beeinträchtigung der kortikalen Plastizität. Sowohl die maternale als auch die neonatale systemische Inflammation sind mit dem Entstehen einer PVL assoziiert und treten bei >65% der VLBW-Frühgeborenen auf (Volpe et al., 2011).

Inflammation kann zu jedem Entwicklungszeitpunkt, allein oder in Zusammenhang mit zusätzlichen Noxen, auftreten. Geht sie einer weiteren Noxe voraus, kann sie die

Vulnerabilität des neonatalen Gehirns für eine Schädigung erhöhen (*sensitization*), je nach Zusammenspiel aber auch protektiven Einfluss nehmen (Hagberg et al., 2015).

### 2.3.2.3 ZEREBRALE HYPOXIE/ISCHÄMIE

Bedingt durch die Unreife der zerebralen Gefäßversorgung und der Unreife der Regulation der zerebralen Perfusion unterliegt die weiße Substanz dem Risiko einer zerebralen Hypoxie/Ischämie. Dies führt unter anderem durch Bildung von freien Radikalen und Aktivierung von Mikroglia zur Schädigung der Myelinisierung (Khwaja and Volpe 2008; Volpe 2001).

## 2.4 CEACAM1

Im Jahr 1965 wurde erstmals von Gold und Freedman ein Molekül beschrieben, das auf Epithelien beim adenomatösen Kolonkarzinom und bei der embryonalen Genese des menschlichen Gastrointestinaltraktes auftritt. Heute ist das Molekül unter dem Namen *carcinoembryonic antigen (CEA)* bekannt (Gold and Freedman 1965), nach ihm wurde die Familie der CEACAMs (*carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecules*) benannt. Inzwischen geht man davon aus, dass das Glykoprotein CEACAM1 das Urmolekül der CEACAMs darstellt. Es trägt alle in der CEACAM-Familie vorkommenden Domänen der Immunglobulin-Familie, sodass die Entstehung weiterer CEACAMs ausgehend von CEACAM1 vermutet wird (Singer et al., 2002).

CEACAM1 ist bisher in Ratte, Maus, Mensch, Rind und vielen weiteren Tieren nachgewiesen worden (Singer and Lucka 2005). Beschrieben wurde CEACAM1 initial als Zelladhäsionsmolekül (Odin et al., 1986; Thompson et al., 1991), mittlerweile ist die Bedeutung der Funktionen bei CEACAM1 von der anfänglichen Zelladhäsion zur Zelldifferenzierung und -proliferation verschiedener Gewebetypen verschoben worden. Es beeinflusst Tumorwachstum (Kunath et al., 1995) Angiogenese (Ergün et al., 2000; Kilic et al., 2005), Immunmodulation (Iijima et al., 2004; Kilic et al., 2007) und Apoptose (Houde et al., 2003; Kirshner et al., 2003).

## 2.4.1 STRUKTUR UND EXPRESSION

Alle CEACAMs sind durch eine N-terminale IgV-ähnliche-Domäne gekennzeichnet, die strukturell an die variable Region der Immunglobuline erinnert. Diese Domäne besteht aus 108-110 Aminosäuren. Abhängig vom CEACAM-Subtyp folgt eine variable Anzahl von IgC-ähnlichen Domänen. Eine weitere Einteilung der CEACAMs erfolgt in die löslichen, transmembranären sowie die Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)- Anker tragenden Formen. Als einziges Mitglied innerhalb der Familie besitzt CEACAM1 ein homologes Gen in Menschen, Maus, Ratte und weiteren Spezies.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Spezies Ratte gearbeitet, daher beziehen sich alle folgenden Informationen zu CEACAM1 auf diese Spezies.

CEA-Gene der Ratte sind auf Chromosom 1 zu finden, durch viele Splice-Varianten steigt die Komplexität der CEACAM-Familie (Thompson et al., 1991). Das Splicing ermöglicht CEACAM1 vor allem durch Variation der Länge seiner zytoplasmatischen Domäne das Entstehen von Isoformen (Edlund et al., 1993; Najjar et al., 1993). Mittlerweile sind 5 verschiedene Splice-Varianten von CEACAM1 in der Ratte bekannt ([www.carcinoembryomic-antigen.de](http://www.carcinoembryomic-antigen.de)).

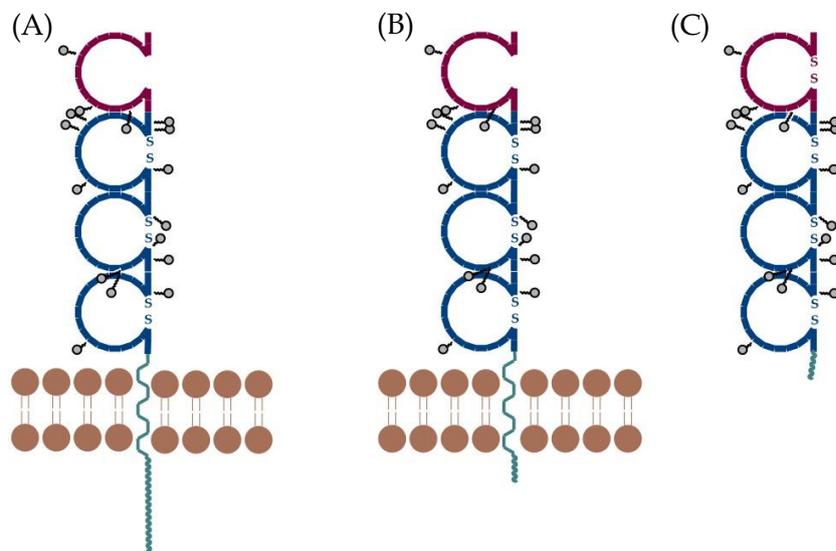


Abbildung 2: Schematische Darstellung von CEACAM1 in der Ratte (modifiziert nach Singer, 2011); hierbei stellt (A) CEACAM1-L, (B) CEACAM1-S und (C) CEACAM1-4C2 dar.

CEACAM1-S trägt die 10-12 Aminosäuren kurze intrazytoplasmatische Domäne und wird dementsprechend mit dem Buchstaben „S“ für „short“ versehen. CEACAM1-L hingegen (intrazytoplasmatische Domäne 71-73 Aminosäuren lang) erhält den Buchstaben „L“ für

„long“ (Öbrink 1997). In der L-Domäne des CEACAM1 wurde *immunreceptor-tyrosine-based-inhibition-motif* (ITIM) nachgewiesen. Durch Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste der ITIM-Motive können Tyrosinkinasen der src-Familie und Tyrosin-Phosphatasen wie SHP1 und SHP2 mit CEACAM1-L assoziieren, wodurch nicht nur die Signalkaskaden weitergeleitet werden, sondern auch Interaktionen mit dem Zytoskelett erfolgen können (Singer 2011). Ferner kann CEACAM1-L, aber auch CEACAM1-S durch eine Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden (Edlund et al., 1998), wodurch die Bindung von Calmodulin reguliert und die Dimerisierung gesteuert werden können (Singer 2011). Neben den transmembranären Isoformen ruft das Splicing auch lösliche Formen hervor: CEACAM1-4C1 und CEACAM1-4C2. Diese können an die transmembranären Isoformen binden und darüber die Signaltransduktion des CEACAM1 in die Zelle regulieren sowie die CEACAM1-abhängige Adhäsion verhindern (Budt et al., 2002; Gray-Owen and Blumberg 2006).

#### 2.4.2 CEACAM1: EIN MULTIFUNKTIONALES SIGNALPROTEIN

Da CEACAM1 in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, wird im Folgenden auf die bedeutenden Aspekte seiner bekannten Funktionen eingegangen.

##### 2.4.2.1 ZELLADHÄSION

Als Mitglied der Immunglobulin-Familie kann CEACAM1 sowohl homophile als auch heterophile Bindungen eingehen. Homophil interagiert es mit membrangebundenen CEACAM1, heterophil mit anderen CEACAMs wie CEACAM6 (CEACAM1-CEACAM6). Als homophiles Adhäsionsmolekül fungiert es sowohl als Rezeptor als auch als Ligand (Oikawa et al., 1992).

##### 2.4.2.2 ZELLDIFFERENZIERUNG UND ZELLPROLIFERATION

Anfangs wurde die Ansicht vertreten, dass CEACAM1 als Tumorsuppressor wirkt. Die tumorsuppressive Funktion wurde durch verschiedene experimentelle Arbeiten gestützt. So war bei der benignen Prostatahyperplasie und bei der hochgradigen prostaticen intraepithelialen Neoplasie, einer Präkanzerose, CEACAM detektierbar. In einem höhergradigen Stadium war CEACAM jedoch abwesend (Kleinerman et al., 1995).

Ebenfalls deutlich verminderte Expressionen wurden beim Mammakarzinom und kolorektalem Karzinom *in vivo* beobachtet (Kirshner et al., 2003; Rosenberg et al., 1993).

Mittlerweile widerlegen neuere Arbeiten die Funktion des CEACAMs als Tumorsuppressor. Bei Patienten mit NSCLC und einer erhöhten CEACAM1 Expression lag eine schlechte Prognose des Krankheitsverlaufes vor (Sienel et al., 2003). Wurde CEACAM1 im Primärtumor eines Malignen Melanoms nachgewiesen, stieg das Risiko für Fernmetastasen an (Thies et al., 2002). Die widersprüchliche Funktion von CEACAM1 sowohl als Tumorsuppressor als auch die Rolle bei der Zellproliferation lässt vermuten, dass weitere Faktoren wichtig sind, beispielsweise das Verhältnis der L-/S-Isoformen oder die Koexpression anderer CEACAMs (Singer 2011).

#### 2.4.2.3 IMMUNMODULATION

Über diverse Co-Rezeptorfunktionen wirkt CEACAM1 immunmodulatorisch. So hemmt CEACAM1-Stimulation die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität, die Apoptose von Monozyten, fördert das Überleben von Granulozyten (Singer et al., 2005), reguliert als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors die T-Zell-Aktivität (Kim et al., 2019), und führt als stimulierender Co-Rezeptor des B-Zell-Rezeptors zur B-Zell-Aktivierung (Chen et al., 2008; Gray-Owen and Blumberg 2006; Greicius et al., 2003).

#### 2.4.3 CEACAM1 IM SICH ENTWICKELNDEN GEHIRN DER RATTE

Nach intensiver Literaturrecherche ließen sich keine neueren Veröffentlichungen im direkten Zusammenhang zwischen CEACAM1 und der neuronalen Entwicklung bei Mammalia finden. Es gab jedoch neuere Erkenntnisse zu CEACAM1, die in Zusammenhang mit z.B. immunologischen oder vaskulären Untersuchungen im ZNS stehen. Die im Verlauf aufgeführten Literaturangaben stellen den aktuellen Wissensstand zu CEACAM1 und der neuronalen Entwicklung im ZNS dar.

Im neonatalen Gehirn und Rückenmark der Ratte findet sich CEACAM1 auf der lumen-abgewandten Seite von Endothelien der Mikrogefäße, hierbei war CEACAM1 hauptsächlich in der Embryonalphase vorhanden. Postnatal ab Tag 14 ließ es sich nur noch vereinzelt, im adulten Zustand gar nicht mehr nachweisen (Sawa et al., 1994). Wichtiger im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Expression von

CEACAM1 auf Oligodendrozyten. Die Expressionsmuster von CEACAM1 entsprechen den Expressionsmustern von MBP, einem Bestandteil des Myelins (Prager et al., 2013). Molekularbiologisch ließen sich die Isoformen CEACAM1-L, -S und -4C2 im sich entwickelnden Rattenhirn nachweisen. Es imponierte ein Isoformenshift (CEACAM1-L zu CEACAM1-S) ab Tag 11 sowie ein kontinuierlicher Abfall um 90% der Expression des CEACAM1-4C2, einem Liganden für die membrangebundenen Isoformen.

Hierauf aufbauend konnte in weiteren Analysen eine veränderte CEACAM1-Expression in einem modifizierten Modell der hyperoxie- und inflammationsinduzierten Frühgeborenenhirnschädigung festgestellt werden. Zudem regte die Stimulation von primären Oligodendrozyten mit einem CEACAM1-Fc-Fusionsprotein *in vitro* diese zur Myelinisierung an (Prager et al., 2013).

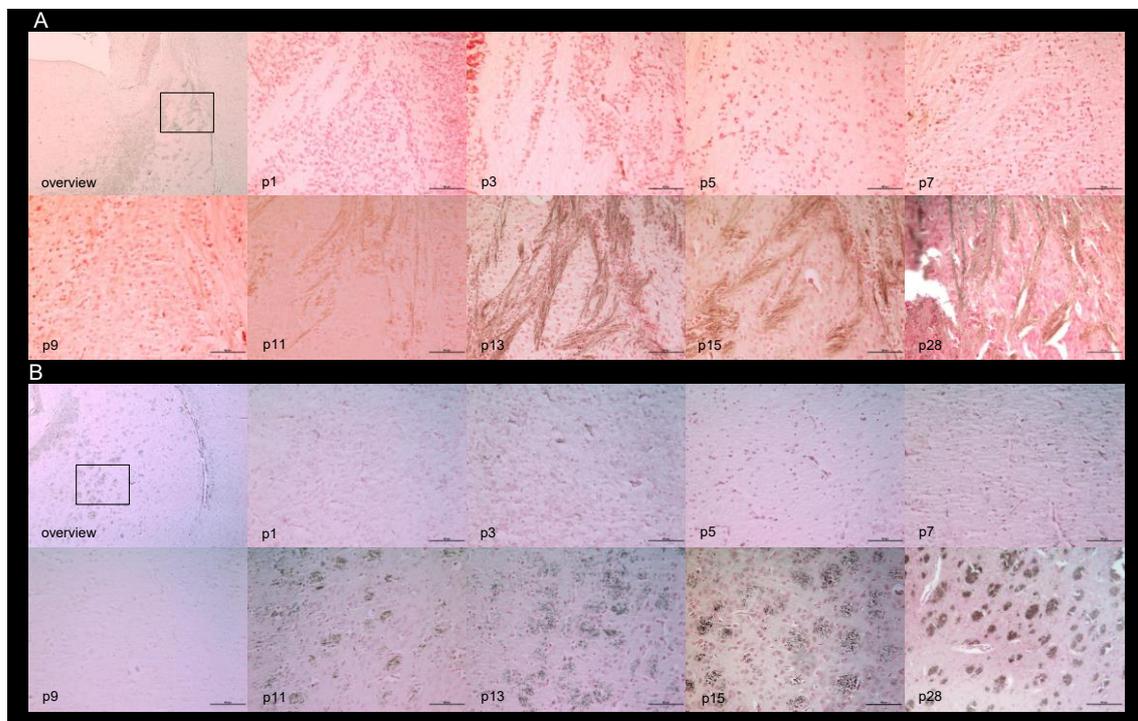


Abbildung 3: CEACAM1-positive Strukturen im Prosencephalon an p1-p28, Nickel-DAB-IHC auf koronaren Hirnschnitten. (Mit Erlaubnis von Dr. med. S. Prager, Kinderklinik I- Neonatologie, Uniklinik Essen).

Die Regulationsmechanismen der Myelinisierung stellen sich als äußerst komplex dar. Die bisherigen Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass CEACAM1 eine relevante Rolle bei der Regulation der Myelinisierung im sich entwickelnden Gehirn einnimmt. Mögliche hierbei zugrunde liegende Signalkaskaden sind Forschungsobjekt dieser Arbeit.

## 2.5 WNT UND TLR

Durch Literaturrecherche wurden zwei Signalwege identifiziert, die das Bindeglied zwischen CEACAM1 und der Steuerung der Myelinisierung darstellen können: der Wnt-Signalweg und der TLR2- und TLR4-Signalweg.

### 2.5.1 WNT-SIGNALWEG

Der Wnt-Signalweg unterteilt sich in den kanonischen und den nicht-kanonischen Signalweg, welcher sich wiederum in den nicht-kanonischen *planar cell polarity pathway* (*PCP pathway*) und den Wnt/Calcium<sup>2+</sup>-Signalweg teilt. Der kanonische Signalweg wurde bisher am ausführlichsten beschrieben. Das zentrale Signalmolekül des kanonischen Signalwegs ist beta-Catenin. Der Aktivierungsstatus des Rezeptors bestimmt über die Konstitution des beta-Catenins (Logan and Nusse 2004). Die weitere Erläuterung bezieht sich ausschließlich auf den kanonischen Signalweg und wird abgekürzt als Wnt-Signalweg bezeichnet.

Beim deaktivierten Wnt-Signalweg wird beta-Catenin durch den beta-Catenin-Destruktionskomplex gebunden und phosphoryliert. Der Destruktionskomplex setzt sich aus den Gerüstproteinen Axin2 und APC (Adenomatous polyposis coli), den beiden Serotonin-/Tyrosinkinase CK1  $\alpha$  und GSK-3, und der Phosphatase PP2A zusammen. Zytoplasmatisches beta-Catenin wird nach Bindung an den Destruktionskomplex primär durch CK1  $\alpha$  und sekundär durch GSK-3 phosphoryliert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Ubiquitinierung des phosphorylierten beta-Catenins durch  $\beta$ -TrCP, gebunden an dem Destruktionskomplex, erfolgt. Anschließend wird das ubiquitinierte beta-Catenin durch das Proteasom abgebaut (Clevers and Nusse 2012; Nusse and Clevers 2017).

Die Bindung von Wnt-Liganden an den heterodimeren Frizzled/LRP 5/6-Rezeptorkomplex an der Zellmembranoberfläche resultiert in der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges. Im Folgenden bindet Dishevelled (dvl) an die zytoplasmatische Domäne des Frizzled, wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, die in der Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) endet. PIP2 dient GSK3 und CK1  $\alpha$  als Substrat zur Phosphorylierung von LRP5/6, durch Phosphorylierung von LRP5/6 wird die Bindung von Axin2 an die zytoplasmatische LRP5/6-Domäne induziert. Der Destruktionskomplex bleibt im Zytoplasma erhalten und lagert sich über Axin2 und dvl an

Frizzled/LRP 5/6-Komplex an. Beta-Catenin wird durch den Destruktionskomplex weiterhin gebunden und phosphoryliert. Die Ubiquitylierung durch  $\beta$ -TrCP bleibt aus, sodass neu synthetisiertes beta-Catenin akkumuliert (Clevers and Nusse 2012; Nusse and Clevers 2017). Die erhöhte beta-Catenin Konzentration führt zum Eintritt von beta-Catenin in den Zellkern und über Interaktion mit den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der Wnt-Zielgene, die bei grundlegenden Entwicklungsprozessen von Bedeutung sind, wie z.B. bei der Differenzierung des zentralen Nervensystems (Saito-Diaz et al., 2013).

Einige Arbeiten zeigen, dass auch die Transkription des Axin2 im Sinne eines negativen Feedbacks über den kanonischen Signalweg durch Transkriptionsfaktoren induziert und zur Hemmung des Wnt/beta-Catenin-Weges führt (Jho et al., 2002).

Der Wnt-Signalweg ist während der Oligodendrozyten-Differenzierung und Remyelinisierung aktiv (Fancy et al., 2009). Über Aktivierung des kanonischen Signalwegs kann beta-Catenin die Entwicklung und Differenzierung von OPCs zu reifen Oligodendrozyten hemmen (Shimizu et al., 2005). In einem *in vivo*-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktives beta-Catenin zur Abnahme der Myelinisierung der Axone führt (Feigenson et al., 2009). Axin2, welches in Oligodendrozyten-Progenitorzellen geschädigter weißer Substanz Neugeborener nach Hypoxie/Ischämie sowie in aktiven MS-Herden bei Erwachsenen exprimiert wird und als negativer Feedback-Mechanismus für den Wnt-Signalweg fungiert, scheint ein wichtiger Regulator der Remyelinisierung zu sein (Fancy et al., 2011).

Weitere Daten zeigen, dass eine Aktivierung von beta-Catenin in neuronalen Progenitorzellen bereits vor Beginn der Gliogenese hemmend auf die Bildung von OPCs wirkt, nach OPC-Bildung aber die Ausreifung fördert (Dai et al., 2014).

Ein weiterer Aspekt der Oligodendrozyten-Differenzierung ist die gerichtete Kommunikation zwischen Neuronen und Oligodendrozyten. Durch das transmembranäre Enzym *Glycerophosphodiester Phosphodiesterase 2* (GDE2), das auf noch sich entwickelnden Neuronen lokalisiert ist, führt über den Wnt-Signalweg zur Freisetzung löslicher Faktoren, u.a. Phosphacan; über Phosphacan wird die Oligodendrozyten-Reifung angeregt (Choi et al., 2020).

In intestinalen Tumoren der Maus interagiert die Isoform CEACAM1-L mit beta-Catenin und moduliert den Wnt-Signalweg (Leung et al., 2008). Zudem zeigt die

Aminosäuresequenz von CEACAM1-L und den Transkriptionsfaktoren TCF-3/4, die an beta-Catenin binden, eine 50%-ige Übereinstimmung. In der selben Arbeit wurde gezeigt, dass CEACAM1-L die Aktivität von beta-Catenin in Jurkat-Zellen reguliert (Jin et al., 2008). Nach aktuellem Stand gibt es keine neueren Publikationen, die den Wnt-Signalweg, CEACAM1 und Oligodendrozyten verbinden.

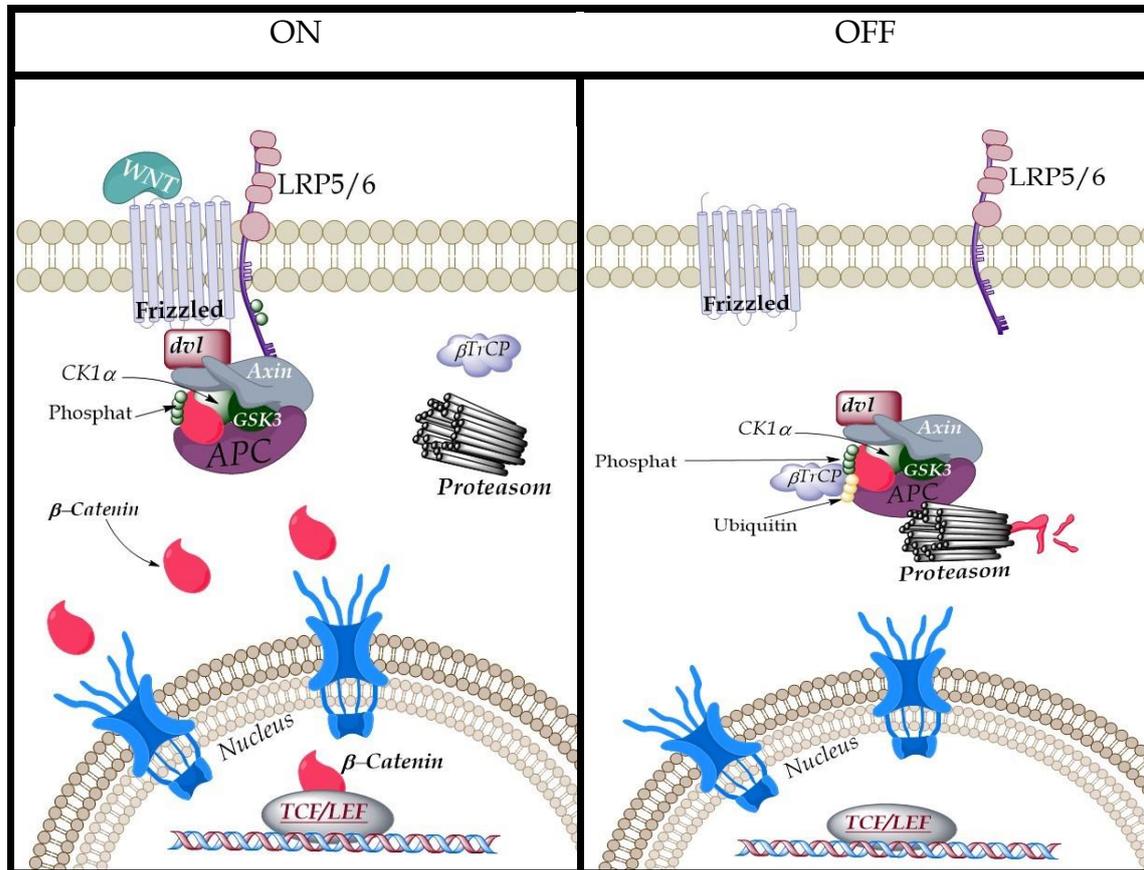


Abbildung 4: Darstellung des Wnt-Signalweges (modelliert nach Clevers and Nusse, 2017). Durch Bindung des Wnt-Liganden an den Frizzled/LRP 5/6-Rezeptor-Komplex wird der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert. Dvl bindet zyttoplasmatisch an Frizzled, sodass die Synthese von PIP2 eingeleitet wird. Nach Phosphorylierung des LRP5/6 durch die GSK3 und CK1a mittels PIP2 kann Axin2 an die zyttoplasmatische LRP5/6-Domäne andocken. Der Destruktionskomplex bindet und phosphoryliert beta-Catenin, die Ubiquitinierung durch  $\beta$ -TrCP bleibt aus, sodass neu synthetisiertes beta-Catenin akkumuliert und in den Zellkern eintritt, wo es über Interaktion den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der Wnt-Zielgene kommt. Im inaktivierten Zustand wird beta-Catenin vom Destruktionskomplex gebunden und phosphoryliert, schließlich wird beta-Catenin durch Ubiquitinierung zum Abbau im Proteasom vorbereitet

## 2.5.2 TLR2- UND TLR4-SIGNALWEG

Toll-like Rezeptoren spielen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem. Mitglieder der TLR-Familie zeigen strukturelle Gemeinsamkeiten: Die extrazelluläre Domäne trägt Leucin-reiche-Repeats (LRR), intrazellulär findet sich eine Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne (Takeda et al., 2003; Takeda and Akira 2015). Neben ihrer Funktion im angeborenen Immunsystem werden Toll-like Rezeptoren auch auf Nicht-Immunzellen exprimiert.

Im Allgemeinen erkennen TLRs Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns = PAMP), wodurch in Abhängigkeit von TLR-Typ und Zelltyp die Transkriptionsrate bestimmter Gene angeregt wird. Über die zytoplasmatische TIR-Domäne wird die Signalkaskade aktiviert. Hierbei differenziert sich die Signalkaskade in einen MyD88-abhängigen und nicht-MyD88-abhängigen Weg (TRIF abhängige Induktion). Nach Stimulation werden IRAK4 und IRAK1 durch MyD88 rekrutiert, dieser Multienzymkomplex wird auch Myddosom genannt. Nach Autophosphorylierung von IRAK1 assoziiert diese mit Traf6 und führt schließlich über weitere Schritte in der Kaskade zur Aktivierung zweier Signalwege, dem MAP-Kinase- oder dem IKK-NF  $\kappa$  B-Komplex-Signalweg (Kawasaki and Kawai 2014). Diese Signalkette mündet in der Expression von inflammatorischen, immunregulatorischen, proliferatorischen und allgemein überlebenswichtigen Genen.

Neben der Rolle im angeborenen Immunsystem ist bekannt, dass TLRs Einfluss auf axonale Kopplung, dorsoventrale Gestaltung neuronaler Strukturen und die Neurogenese im Hippokampus nehmen (Rolls et al., 2007). TLR2- und TLR4-mRNA konnten während der Oligodendrozyten-Reifung nachgewiesen werden (Bsibsi et al., 2012). Desweiteren ließ sich auf der Membranoberfläche von Oligodendrozyten TLR2 immunhistochemisch nachweisen (Bsibsi et al., 2012; Choi and Kim 2017; Lehnardt et al., 2006). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass TLR2 und TLR4 bereits auf undifferenzierten neuronalen Stammzellen exprimiert werden (Grasselli et al., 2018). Eine TLR4-Hemmung induziert durch einen TLR4-Antagonisten führte in derselben Arbeit zu einer Abnahme der Proliferation neuronaler Stammzellen, sodass auch hier der positive Einfluss von TLR4 auf die Oligodendrozyten-Differenzierung angenommen wird (Grasselli et al., 2018).

Desweiteren ließ sich durch die intraspinale Gabe eines synthetischen TLR4-Agonisten (E6020) ein signifikanter Anstieg der Oligodendrozyten-Anzahl verzeichnen (Church et al., 2017).

Durch IHC konnte eine Kollokalisierung von CEACAM1 und TLR2 auf der Zellmembranoberfläche von pulmonalen Epithelzellen nachgewiesen werden. Über mehrere Zwischenschritte inhibiert CEACAM1 den TLR2-abhängigen Signalweg (Slevogt et al., 2008). Weiterführende Studien haben gezeigt, dass der inhibitorische Mechanismus auf einer Wechselwirkung des löslichen CEACAM8 mit dem membrangebundenen CEACAM1 beruht. Hierbei führt die Interaktion der beiden CEACAMs zu einer Phosphorylierung des ITIM-Motifs des CEACAM1, welches zu einer Rekrutierung von SHP-1 (*Sonic Hedgehog Protein 1*) führt. Die Interaktion zwischen TLR2 und SHP-1 resultiert in einer negativen Regulation der TLR2-abhängigen Aktivierung des PI(3)K (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-kinase*) - Akt1 (*Proteinkinase B*) - NF  $\kappa$  B-Signalweges (Singer et al., 2014).

Über CEACAM1 wird der LPS/TLR4-Signalweg, der zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen dient, inhibiert. Vergleichbar mit der Inhibition des TLR2-Signalwegs durch CEACAM1 wird auch hier SHP-1 mit CEACAM1 assoziiert, was zu einer Dephosphorylierung von Syk (*Spleen Tyrosine Kinase*) führt. Dies führt zu einer verminderten Aktivierung des Inflammasoms und hierdurch zu einer verminderten Umwandlung von pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  (Lu et al., 2012).

Neuere Erkenntnisse zeigen in intestinalen Endothelzellen, dass eine TLR2- bzw. TLR4-Stimulation zu einer Hochregulierung der CEACAM1-Gene und Genprodukte führt (Schirbel et al., 2019).

Eine Expression von TLR4 in Oligodendrozyten/OPCs wurde auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Bsibsi et al., 2012). Daher, und aufgrund des von uns verwendeten Schadensmodells mit LPS als Noxe, die über TLR4 wirkt, ist eine Analyse dieses Signalweges notwendig. Um mögliche Anknüpfungspunkte zwischen CEACAM1 und dem TLR-Signalweg unter Berücksichtigung des in dieser Arbeit verwendeten Schadensmodells aufzeigen zu können, muss der TLR-Signalweg, im Speziellen für TLR2 und TLR4, noch differenzierter aufgezeigt werden. LPS interagiert über Zwischenschritte im Serum mit TLR4. Es bildet sich hiernach ein Oligomer aus TLR4/MD-2/LPS, worüber über die intrazelluläre TIR-Domäne, wie TIRAP und Ticam2, die weitere Signalkaskade

aktiviert wird. Über das Myddosom wird Traf6 polyubiquitiniert und dadurch aktiviert, was zur Rekrutierung von TAK1 führt. TAK1 kann im Verlauf zwei verschiedene Signalwege steuern, den MAP-Kinase- und den IKK-NF  $\kappa$  B-Komplex-Signalweg. Im TRIF abhängigen Signalweg interagiert Ticam2 zwischen TLR4 und TRIF. TRIF rekrutiert Traf6, welche über RIP-1 die Kaskade des MyD88 abhängigen Signalwegs bedient (Kawasaki and Kawai 2014; Takeda et al., 2003; Takeda and Akira 2015). Nach aktuellem Stand gibt es keine neueren Publikationen, die den TLR2/4-Signalweg, CEACAM1 und Oligodendrozyten verbinden.

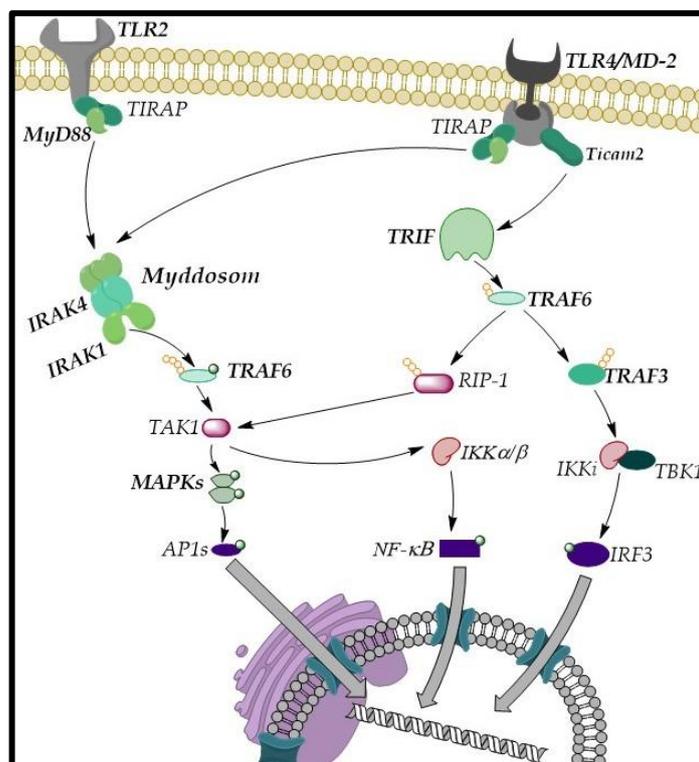


Abbildung 5: Darstellung des TLR2/4-Signalweges (modelliert nach Takeda und Akira, 2015). TLR2 und TLR4 befinden sich auf der Zelloberfläche; ausgehend von TLR4 und TLR2 wird das Signal nach intrazellulär entweder über TIRAP und MyD88 zum Myddosom weitergeleitet, wo IRAK1 und IRAK4 sitzen. Über IRAK1 erfolgt die Aktivierung von Traf6 mit Polyubiquitinierung von Traf6 und TAK1. Schließlich wird über TAK1 der IKK (inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase)-Komplex-NF- $\kappa$ B und/oder der MAPK-Weg aktiviert. Die Signalweiterleitung kann bei TLR4 statt über TIRAP auch über Ticam2 und TRIF mit Mündung im IKK Komplex-NF- $\kappa$ B und MAPK-Weg erfolgen

## 3 MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden neugeborene Wistar-Ratten verwendet und der Tag der Geburt als P0 festgelegt. Für die Zellkultur wurden Sprague Dawley Ratten verwendet. Die Tiere wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen von ausgebildeten Tierpflegern gehalten und überwacht (§2 TierSchG). Unter Berücksichtigung von §8 und §8a wurden die Versuche in den Laborräumen der Neonatologie durchgeführt.

#### 3.1.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL

##### 3.1.2.1 HISTOLOGIE

Bezeichnung	Hersteller
Ausgießformen	Sakura Finetek Europe B.V, Staufen, Deutschland
Ausgießstation	Medite TBS 88 Paraffin Embedding System, Burgdorf, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Coverplates	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Einbettautomat	Shandon Pathcentre Tissue Processor, Ramsey, MN, USA
Einbettkassette	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Durchlicht und Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzlampe Colibri.2	Carl Zeiss
Konfokalmikroskop	Nikon, Minato, Tokio, Japan
Objektträger	SuperFrost, R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

<b>Objekttrgergestell für Coverplates</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Mikroskop</b>	Carl Zeiss
<b>Mikrotom HM 430</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Paraffinstreckbad</b>	Kunz Instruments HIR-3, Vallentuna, Schweden
<b>Pipetten</b> 0,5 - 10 $\mu$ l, 2,0 - 20 $\mu$ l 20 - 200 $\mu$ l, 100 - 1000 $\mu$ l	Eppendorf Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Histologie

### 3.1.2.2 MOLEKULARBIOLOGIE

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Combitips®</b>	Eppendorf Hamburg, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße, 1,5 ml/2,5 ml</b>	Eppendorf
<b>15 ml Röhrchen, konisch (Cellstar®)</b>	Grainer bio-one, Monroe, North Carolina, USA
<b>Mikrotiterplatten 96-Well</b>	Eppendorf
<b>Mikrozentrifuge</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Multipette®</b>	Eppendorf
<b>My-Budget 8er Strips</b>	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
<b>NanoDrop® 1000 Mikrospektrophotometer</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Optische Klebefolie</b>	MicroAmp® Adhesive Optical Film, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<b>Pipetten</b> 0,5 - 10 $\mu$ l, 2,0 - 20 $\mu$ l 20 - 200 $\mu$ l, 100 - 1000 $\mu$ l	Eppendorf
<b>Pipettenspitzen mit Filter, autoklaviert</b>	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
<b>StepOne Plus Real-Time PCR Systems</b>	Thermo Fisher Scientific

<b>T3 Thermocycler</b>	Biometra, Göttingen, Deutschland
<b>Tischzentrifuge</b>	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Molekularbiologie

### 3.1.2.3 ZELLBIOLOGIE

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>5% CO<sub>2</sub> - Inkubator</b>	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
<b>Deckgläser</b>	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
<b>Mikroskop</b>	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
<b>Petrischalen, Ø 60 mm</b>	Grainer bio-one
<b>15 ml Röhrchen, konisch (Cellstar®)</b>	Grainer bio-one, Monroe, NC, USA
<b>Sterilbank</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>24-Well Platten</b>	Grainer bio-one
<b>Zellkulturflasche</b>	Grainer bio-one

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Zellbiologie

### 3.1.2.4 CHEMIKALIEN UND PHARMAKA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich, MO, USA
<b>BSA, Fraktion V</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Chloralhydrat</b>	Sigma-Aldrich
<b>Chloroform</b>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<b>Ciliary neurotropic factor (CNTF)</b>	PAN-Systech GmbH, Aidenbach, Deutschland
<b>Cold-Water-Fish-Skin- (CWFS) Gelatine</b>	Sigma-Aldrich
<b>Dako Fluorescent Mounting Medium</b>	Dako, Glostrup, Dänemark
<b>D-Biotin</b>	Sigma-Aldrich

<b>Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (1 U/ml)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>10x DNase I Reaction Buffer</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>dNTP 10 mM</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>0,1 M DTT</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>25 mM EDTA</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Ethanol, 100% vergällt</b>	Apotheke des Universitätsklinikums Essen
<b>5x First Strand Buffer</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Humanes apo-Transferrin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF)</b>	PAN-Systech GmbH, Aidenbach, Deutschland
<b>Human recombinant platelet derived growth factor (PDGF)</b>	PAN-Systech GmbH
<b>Hydrocortison</b>	Sigma-Aldrich
<b>Insulin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Isopropanol</b>	Sigma-Aldrich
<b>Lipopolysaccharid (LPS)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Applichem
<b>Oligo dT</b>	CARLO ERBA, Val de Reuil, Frankreich
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Poly-L-Ornithin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Random primer</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>SuperScript II Reverse Transcriptase</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>SYBR-Green® PCR Master Mix (2x)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)</b>	Thermo Fisher Scientific

<b>Trijodthyronin (T3)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Tris-base</b>	AppliChem
<b>Tri-Sodium-Citrat</b>	AppliChem
<b>Trizol (TRIZOL® Reagent)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Trypsin-EDTA 0,05%</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich
<b>Xylol</b>	AppliChem

Tabelle 4: Chemikalien und Pharmaka

### 3.1.2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN

<b>PBS (10-fach Konzentrat), pH 7,4</b>	Für 1000ml: NaCl 80 g, KCl 2,0 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 14,4 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 g 1000 ml destilliertes Wasser
<b>PBS, 1% BSA, 0,3% CWFS-Gelatine Blockpuffer</b>	Für 100 ml: 1 g BSA, 0,3 g CWFS-Gelatine, 100 ml 1-fach konzentriertes PBS
<b>4 % PFA-PBS (pH 7,4)</b>	40 g PFA in 1000 ml 1-fach konzentriertem PBS,
<b>15% Chloralhydrat-Lösung</b>	1,5 g Chloralhydrat in 10 ml 1-fach konzentriertem PBS gelöst
<b>IHC- Blockpuffer (Stammlösung)</b>	100 ml 1-fach konzentrierte Tris-gepufferte Salzlösung, 10 g BSA, 3 g CWFS- Gelatine, 1 ml Tween 20
<b>IHC-Blockpuffer (Gebrauchslösung)</b>	8,1 ml destilliertes Wasser, 0,9 ml 10-fach konzentrierte Tris-gepufferte Salzlösung, 1 ml IHC-Blockpuffer (Stammlösung)
<b>3% Normal Goat Serum (NGS)/ PBS - Blockpuffer</b>	Für 100ml: 97 ml 1-fach konzentriertes PBS, 3 ml NGS

### 3.1.2.6 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

<b>Proliferationsmedium (PM)</b>	0,1% BSA, 50 µg/ml humanes apo-Transferrin 50 µg/ml Insulin, 30 µg/ml Natriumselenit 10 nM D-Biotin, 10 nM Hydrocortison
----------------------------------	--

	10 ng/ml rekombinantes humanes PDGF 10 ng/ml rekombinantes humanes bFGF
<b>Differenzierungsmedium (DM)</b>	0,1% BSA, 50 µg/ml humanes apo-Transferrin 50 µg/ml Insulin, 30 µg/ml Natriumselenit 10 nM D-Biotin, 10 nM Hydrocortison 10 ng/ml CNTF, 15 nM T3

### 3.1.2.7 ANTIKÖRPER

<b>Antigen</b>	<b>Antikörper- Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Interaktion / Detektion</b>
<b>Kaninchen IgG</b>	Alexa Fluor 594 Ziege, anti- Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
<b>Maus IgG</b>	Alexa Fluor 488 Ziege, anti-Maus IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	
<b>Maus IgM</b>	Alexa Fluor 594 Ziege, anti-Maus	Thermo Fisher Scientific	
<b>Myelin Basic Protein</b>	SMI-99 (Maus monoklonal)	BioLegend Zuvor als Antikörper im Covance-Katalog unter SMI-99P	Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Ser in Position 131-136 des Myelin Basic Protein vieler Säugetiere
<b>Oligodendrocyte Marker O1</b>	MO15001 (Maus monoklonal, IgG)	Neuromics	Galactosylcerebroxid, was durch terminale differenzierte Oligodendrozyten exprimiert wird

<b>Oligodendrocyte Marker O4</b>	MO15002-50 (Maus monoklonal, IgG)	Neuromics	Sulfatiertes Glycolipid Antigen, Preoligodendrocyte Antigen (POA) später OPC oder mit sulfatiertem Galactosylcerebroxid differenzierter Oligodendrozyten
<b>ratCEACAM1</b>	antiCEACAM1 (Kaninchen polyklonal)	Dr. rer. nat. Singer, Universitätsklini- kum Essen	
<b>Toll-Like- Rezeptor 2</b>	mT2.4 (Maus monoklonal)	Thermo Fisher Scientific	Murin medierte TLR2- Zellaktivität
<b>Toll-Like- Rezeptor 4</b>	TLR4 Antikörper (Kaninchen polyklonal)	Abbiotec	LPS medierte TLR4- Zellaktivität
<b>beta-Catenin</b>	sc-7963 (Maus monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology	Aminosäuren 680-781 am C-terminalen Ende des humanen beta-Catenin, auch Spezies Maus und Ratte möglich

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

### 3.1.2.8 PRIMER

Primer	Sequenz
CEACAM1 forward-1	5' ATCAGTGTGAGATCTCCAACCCGGTC 3'
CEACAM1 forward-2	5' GTGAGATCTCCAACCCGGTCAGTTTC 3'

CEACAM1 reverse all	5' GTTCAGGACAGAGTATGAGACGTCA TCC 3'
CEACAM1 reverse L	5' CTGGAGGTTGAGGGTTTGTGCTC 3'
CEACAM1 reverse S	5' CGTCAGAAGGACCCAGATCCG 3'
CEACAM1 reverse 4C2	5' TCGTCAGAAGGACCCAGATGTATT 3'
CEACAM1 probe L + S	6-FAM- TTGGATCTGTGGCTGGAGT -BHQ1
Rat Axin 2 Forward	5' CGACGATTCCATGTCCATGAC 3'
Rat Axin 2 Reverse	5' TCACACTGCGGTGCATCTCT 3'
Rat Beta-Catenin Forward	5' ACTTGCCACCCGTGCAAT 3'
Rat Beta-Catenin Reverse	5' TTTGGAAAGCTGGTGAACCAT 3'
Rat Traf 6 Forward	5' CAGGCGTGTAGCCTCCACTT 3'
Rat Traf 6 Reverse	5' ACCTCTCCCACCGTTTGTACT 3'
Rat MyD88 Forward	5' TACATACGCAACCAGCAGAAACA 3'
Rat MyD88 Reverse	5' TGGTGATGCCTCCCAGTTC 3'
Rat Ticam 2 Forward	5' GCCAGTGGGCAGCTATTCTC 3'
Rat Ticam 2 Reverse	5' GCTTCGGTTTTTCCCATCTTG 3'

Tabelle 6: Verwendete Primer

Vor Benutzung wurden die jeweiligen Vorwärts- (Forward) und Rückwärts-(Reverse)-Primer sowie die Sonden (Probes) als Stammlösungen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 100 µmol/l verdünnt. Die Aliquots der beiden Primer wurden anschließend in eine gemeinsame Verdünnung überführt, in der jeder Primer in der Konzentration von 5 µmol/l als Arbeitslösung vorlag. Die Sonden wurden auf eine Konzentration von 5 µmol/l verdünnt. Alle Primer und Probes wurden bezogen von: BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin.

### 3.2 EXPERIMENTELLES DESIGN

Die Experimente wurde basierend auf dem kombinierten Hyperoxie-/Inflammations-Schadensmodell von Brehmer et al. (Brehmer et al., 2012) durchgeführt. Bei diesem

Schadensmodell werden die Tiere direkt postnatal in folgende vier Versuchsgruppen (Tabelle 7) randomisiert:

Gruppe	Behandlung p3	Behandlung p5-p6
NO/NaCl	NaCl 0,9% i.p.	Normoxie
NO/LPS	0,25 mg/kg LPS in NaCl 0,9% i.p.	Normoxie
HO/NaCl	NaCl 0,9% i.p.	Hyperoxie FiO <sub>2</sub> 0,8 für 24 h
HO/LPS	0,25 mg/kg LPS in NaCl 0,9% i.p.	Hyperoxie FiO <sub>2</sub> 0,8 für 24 h

Tabelle 7: Einteilung der Versuchstiere

Aus diesem Versuchsaufbau resultieren neben der Kontrollgruppe (Normoxie/NaCl) drei Gruppen, welche die Wirkung einer alleinigen Hyperoxie oder Inflammation (LPS) sowie der Kombination beider Noxen darstellen. Ein Teil der Versuchstiere wurde an p6 getötet, während ein weiterer Teil an p11 getötet wurde. Jedes Tier wurde an p3, p5 und p6, sowie bei Tötung an p11 auch an p9 und p11 gewogen. Um möglichst homogene Gruppen zu erhalten, wurden Tiere, die an p3 außerhalb des Gewichtsbereiches von 8,4-10,6 g lagen, ausgeschlossen.

Nach Paxinos & Watson *The Rat Brain Atlas* wurden für die histologische Analyse Coronarschnitte ausgewählt, die im Mesencephalon Bregma -6,84 mm und im Hippocampus Bregma -2,76 mm entsprechen. Diese Schnitte wurden im Hinblick auf

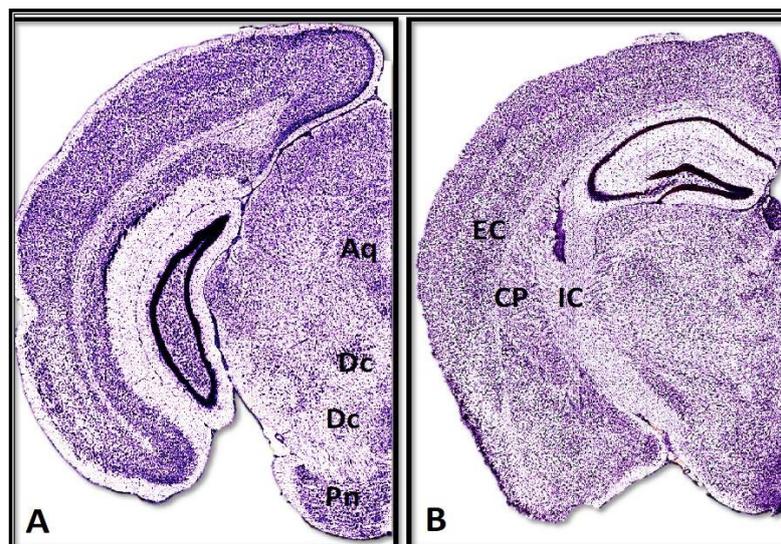


Abbildung 6: Schmittebenen A & B (Koronarschnitte des Rattengehirns), die für die immunhistochemische Analyse gewählt wurden (modifiziert nach Paxinos & Watson *The Rat Brain Atlas*, 2007). Ebene 1 (A): Pontine Kerne und aquaeductus mesencephali. Zwischen den pontinen Kernen (Pn) und aquaeductus mesencephali (Aq) sind Decussationen (Dc) zu erkennen Ebene 2 (B): Decussatio der Capsula interna und Capsula externa. An der Spitze des Hippocampus entfalten sich die Strukturen der Capsula interna (IC) und externa (EC).

Myelinisierung und CEACAM1- Expression untersucht. Die Auswahl der Ebenen erfolgte aufgrund der bisherigen Ergebnisse der spatiotemporalen CEACAM1-Expression.

Für die molekularbiologischen Analysen wurden zunächst die kompletten Hemisphären ohne Riechhirn und ohne die Kleinhirnhemisphären an p6 und p11 verwendet und analysiert. Um die Großhirnhemisphären mit einer Region zu vergleichen, wurde zudem der Cortex einzeln präpariert und analysiert.

### **3.3 HISTOLOGISCHE METHODEN**

#### **3.3.1 AUFARBEITUNG DER HIRNE**

Um das histologische Gewebe zu gewinnen, wurden die Versuchstiere an p11 mit 15%iger Chloralhydrat-Lösung tief sediert, dabei wurde eine Dosis von 0,1 ml/10 g gewählt. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz freipräpariert. Nach Punktion des linken Ventrikels sowie Eröffnung des rechten Vorhofs erfolgte die Perfusion mit initial 15-20 ml gekühltem PBS (pH= 7,4) und anschließend mit 4%iger gekühlter Paraformaldehyd- Lösung (20-25 ml).

Nach Eröffnung des Schädels wurde das Gehirn mithilfe eines Spatels an der Schädelbasis mobilisiert und schadenfrei entnommen. Durch einen koronar gesetzten Schnitt wurden Groß- und Kleinhirn voneinander getrennt und für weitere Analysen separat eingebettet. Zur Fixierung wurde das Gewebe bei 4°C für 72 Stunden in 4% Paraformaldehyd eingelegt.

#### **3.3.2 PARAFFINEINBETTUNG**

Die Gehirnproben wurden in einem Einbettautomaten (Shandon Pathcentre Tissue Processor) automatisch dehydriert und in Paraffin überführt, dies erfolgte durch die Pathologie des Universitätsklinikums Essen. Jede Probe wurde jeweils für eine Stunde in 2 x 70% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 2x 100% Ethanol und 3x Xylol durchtränkt, bevor sie in 4 verschiedenen Paraffinbädern bei 55-65°C für je zwei Stunden verweilte. Die Einbettung der Proben erfolgte so, dass bei der Anfertigung der Paraffinschnitte Koronarschnitte entstehen.

### 3.3.3 ANFERTIGUNG DER PARAFFINSCHNITTE

Nach der Einbettung in Paraffin wurden mit dem Mikrotom (Thermo Fisher Scientific Mikrom HM 430) 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem Streckbad (Kunz Instruments) auf Objektträger gezogen und für 24 Stunden in einem Brutschrank (Binder) bei 54°C zum Trocknen aufbewahrt. Auf jedem Objektträger (SuperFrost®) wurden vier Schnitte aufgebracht. Jeder fünfte Objektträger wurde für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur anatomischen Orientierung verwendet.

### 3.3.4 IMMUNHISTOCHEMISCHES PROTOKOLL FÜR CEACAM-1 UND MBP

Das vorliegende Protokoll wurde für die Darstellung von CEACAM und MBP auf Paraffinschnitten verwendet. Das Prinzip der Immunhistochemie lässt sich folgendermaßen erklären:

- Primärer Antikörper bindet an Antigen, welches man darstellen möchte
- Sekundärer Antikörper bindet an den primären Antikörper
- Sekundärer Antikörper ist markiert zur Detektion der Strukturen (Fluoreszenzmarkierung)
- Kernfärbung mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol), einem Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung der DNA

Für die weitere Verarbeitung werden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe, die mit dem Waschen in destilliertem Wasser endet, entparaffinisiert. Dadurch werden die Gewebeschnitte in ein hydrophiles Milieu überführt, um Antikörper-Epitop-Bindungen zu ermöglichen. Ergänzend werden Blockpuffer verwendet, damit unspezifische Bindungen, die nicht nachgewiesen werden sollen, vermieden werden.

Ziel der immunhistochemischen Färbung ist der Nachweis eines spezifischen Epitops mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper). Für eine starke Antigen-Antikörper-Bindung ist eine hohe Affinität des Antikörpers zum Epitop erforderlich, um Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen zu vermeiden. Hierdurch kann ein ausreichendes Signal am Ort des Epitops erkannt werden.

Bei Kofärbungen werden zwei Epitope unter Verwendung von zwei Antikörpern erkennbar gemacht.

Werden Schnitte gleichzeitig mit mehreren primären Antikörpern angefärbt, die gegen unterschiedliche Strukturen gerichtet sind, sollten diese Antikörper aus verschiedenen Spezies stammen. Beim Nachweis der Strukturen wird der sekundäre Antikörper so ausgewählt, dass dieser sich spezifisch an einen primären bindet. Auf diese Weise können Kofärbungen Indiz auf räumliche Kolo-kalisationen geben.

Die Immunhistochemie dieser Arbeit wurde für die einzelnen primären und sekundären Antikörper mit optimierten Standardprotokollen des Forschungslabors der Kinderheilkunde 1 durchgeführt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper können der *Tabelle 5* entnommen werden.

### **Immunhistochemisches Protokoll für CEACAM1 und MBP:**

#### *Tag 1*

Für die Durchführung der immunhistochemischen Schritte (Entparaffinisierung, Färbung) wurden Färbeküvetten verwendet.

1. Xylol je 2 x 5 min
2. Absteigende Ethanolreihe und Rehydrierung mit 100%, 70% und 50% Ethanol und destilliertem Wasser für jeweils 2 x 5 min
3. Spülen mit PBS für 5 min
4. Blockieren mit PBS pH 7,4 mit 1% BSA und 0,3% CWFS- Gelatine für 60 min
5. Primärer Antikörper (CEACAM1) in einer Verdünnung von 20 µg/ml und zweiter primärer Antikörper für die Kofärbung (MBP) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS pH 7,4 mit 1 % BSA und 0,3% CWFS-Gelatine über Nacht bei 4°C

#### *Tag 2*

6. Spülen mit PBS für 3 x 5 min
7. Sekundäre Antikörper Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS für 60 min
8. Spülen mit PBS für 5 min
9. Gegenfärben mit PBS-DAPI (100 ng/ml) für 5 min
10. Spülen mit PBS für 5 min

11. Schnitte von den Abdeckplatten befreien und in eine Küvette mit destilliertem Wasser stellen für 3 x 5 min
12. Eindecken mit Dako Fluorescent Mounting Medium
13. Schnitte über Nacht bei 4°C trocknen lassen

Primäres Antigen	Antikörper
ratCEACAM1	antiCEACAM1 (Kaninchen polyklonal)
Myelin Basic Protein	SMI-99P (Maus monoklonal)
Sekundäres Antigen	Antikörper
Maus IgG	Alexa Fluor 488 Ziege, anti-Maus IgG (H+L)
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 594 Ziege, anti-rabbit

Tabelle 8: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

### 3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.4.1 PRÄPARATION DER HIRNREGIONEN

Ähnlich dem Gewebe für die Histologie erfolgte die Aufarbeitung der Hirne für die molekularbiologischen Methoden. Nach tiefer Sedierung der Tiere mit 15%iger Chloralhydrat-Lösung (0,1 ml/10 g) wurden die Tiere mit 10 ml/10 g PBS perfundiert. Nach Dekapitation wurde der Schädel sagittal eröffnet und anschließend das Gehirn freigelegt. Dieses wurde aus der Schädelkalotte entnommen und in einer Petrischale für die weitere Präparation der einzelnen Hirnregionen aufbewahrt. Nach Abtrennung des Bulbus olfactorius und Cerebellum wurden die Hemisphären getrennt, seitengetreunt direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für Analysen der Regionen wurde nach Abtrennung des Bulbus olfactorius und Cerebellum das restliche Hirn in zwei Scheiben geteilt, die Scheiben in der Mitte durchgetrennt und anschließend Cortices frei präpariert (s. Abb. 7). Schließlich wurde das

Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

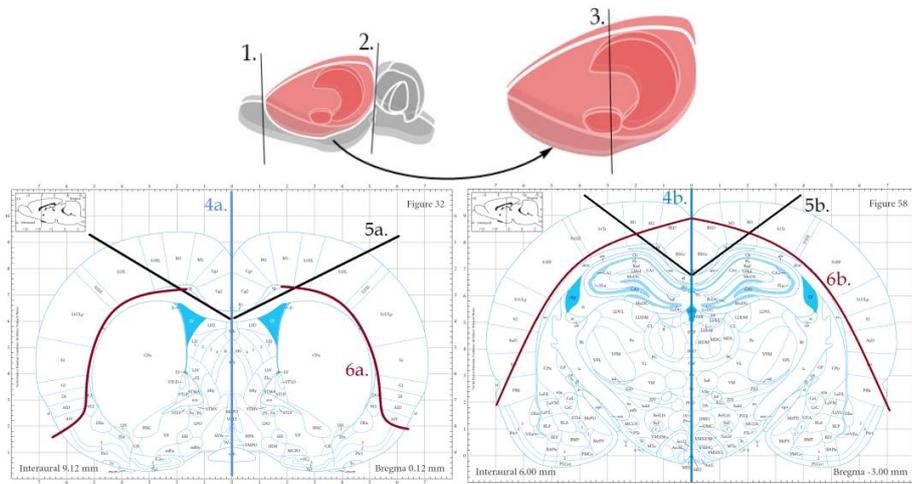


Abbildung 7: Präparation der Hirnregionen. Nach Abtrennung von Bulbus olfactorius und Cerebellum wurde das Gehirn in zwei Scheiben geschnitten und in der Mitte gespalten (4a, 4b). Anschließend wurden die Anteile des Cortex (Schnittlinien 5a und 6a bzw. 5b und 6b) freipräpariert. Dargestellte Schnittebenen modifiziert nach Paxinos & Watson *The Rat Brain Atlas*, 2007.

### 3.4.2 RNA-ISOLATION

Nach der Präparation der Hirnregionen erfolgt die RNA-Isolation.

Das Grundprinzip der RNA-Isolation lässt sich in drei Schritte unterteilen:

1. Zellyse
2. Inaktivierung von RNasen
3. Isolation der RNA

Bei der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi aus dem Jahr 1987 wird für den ersten Schritt TRIzol®, ein homogenes Gemisch aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol, verwendet. Neben seiner denaturierenden und lysierenden Wirkung inhibiert das enthaltene Guanidiniumthiocyanat auch RNasen. Nach Zugabe von Chloroform trennt sich das Gemisch in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblose, wässrige obere Phase, die RNA beinhaltet, auf.

Entsprechend dem laborinternen Protokoll wurde das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Gewebe als erstes in Falcon-Röhrchen (Grainer bio-one, Monroe, North Carolina, USA) gegeben und in TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, USA) aufgelöst, dies erfolgte durch Homogenisieren mit der Pipette.

Hierbei gilt die Regel: 1 ml TRIzol® pro 75 mg Gewebe. Durch Homogenisieren des Gemisches, löst sich das Gewebe im TRIzol® auf.

Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurden 0,2 ml Chloroform pro Milliliter TRIzol® hinzugefügt und die Proben mit dem Vortexer geschüttelt, bis sich die Chloroform- mit der TRIzol®-Phase vermischt und die Lösung eine homogene Farbe annahm. Nachfolgend wurden die Gemische auf Eppendorf-Mikrogefäße verteilt und für weitere 3 min inkubiert.

Anschließend wurden die Proben bei 12 000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das Gemisch trennt sich in drei Phasen auf, wovon die obere farblose, wässrige Phase, die die RNA beinhaltet, für die weitere Verwendung genutzt wird.

Diese obere Phase wurde in neue Gefäße pipettiert und mit einer identischen Menge Isopropanol vermischt, bevor sie erneut mit dem Vortexer geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert wurde.

Nach Zentrifugation bei 12 000 x g für 10 min bei 4°C und Entfernen des Überstandes wird im Folgenden jedes Pellet mit 70%igem Ethanol (1 ml 70%iges Ethanol pro Milliliter verwendetem TRIzol®) versetzt. Es wird erneut mit dem Vortexer geschüttelt und anschließend bei 7 500 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um schließlich erneut den Überstand zu entfernen.

Nach Trocknung bei RT für 10 min wurde die resultierende reine RNA in 30-100 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst (Thermomixer bei 65°C für 15 min) und anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.4.3 RNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Nach der RNA-Isolation erfolgt die Konzentrationsbestimmung mittels Mikrospektrophotometer (Nanodrop® 1000, Thermo Fisher Scientific, USA), hierbei wird die RNA auch auf ihre Reinheit geprüft. Dafür wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm (A260/A280) verwendet.

Für pure RNA liegt das Verhältnis A260/A280 zwischen den Werten 2,0 bis 2,2, niedrigere Werte sind ein Indiz für eine Kontamination. Bei dieser Versuchsreihe wurden Werte von 2,0 +/- 0,2 zugelassen.

#### 3.4.4 PCR

Die PCR oder auch Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* = PCR) ist das Standardwerkzeug der modernen Biologie und Medizin für genetische Forschungen.

Das PCR-Prinzip bedient sich dem natürlichen Vorbild der DNA-Vervielfältigung in jeder lebenden Zelle, der DNA-Replikation. Diese Methode wird *in vitro* verwendet, um aus einer geringen Menge an genetischem Material durch die exponentielle Vermehrungsrate der DNA bei der Replikation eine komfortable Menge an DNA für weitere Untersuchungen zu erhalten.

Zunächst wird bei der PCR ein DNA-Doppelstrang (in der Regel) unter Hitzeeinwirkung ( $\sim 90^{\circ}\text{C}$ ) denaturiert, genauer die Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaarung werden aufgeschlossen, und in zwei Einzelstränge aufgebrochen, die in ihrer jeweiligen strukturellen Integrität durch die Hitzeeinwirkung nicht geschädigt werden. Diese Einzelstränge dienen im weiteren Verlauf als Matrize für die PCR. Im nächsten Schritt wird durch die Anlagerung (Annealing) von spezifischen Oligonucleotidsequenzen, sogenannte Primer, sowohl am 5'- als auch 3'-Ende des zu amplifizierenden Abschnitts der Startpunkt für den neu zu synthetisierenden Strang gelegt. Es folgt die Elongation des neuen Stranges durch eine Polymerase, die auch in lebenden Zellen für die DNA-Replikation verantwortlich ist, unter Einbau von freien Nucleotiden, sodass ein komplementärer Strang zum Ausgangstemplate entsteht. Der gesamte Vorgang von Denaturierung, über Annealing und Elongation wird so oft wie nötig wiederholt, sodass am Ende eine ausreichende Menge an genetischem Material zur Verfügung steht.

#### 3.4.5 REVERSE TRANSKRIPTION DER RNA

Die Reverse Transkription (RT) stellt die grundlegende Voraussetzung zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit RNA als Ausgangsmaterial dar. Da nach der RNA-Isolation kein absolut DNA-freies Isolat vorliegt, muss im Folgeschritt die noch vorhandene DNA enzymatisch durch DNase abgebaut werden (DNase I Reaktion). Die RT ist die umgekehrte Transkription im genetischen Sinne; hierbei wird aus einer RNA-Matrix eine dazugehörige komplementäre DNA (cDNA) angefertigt. Oligo dT, eine Sequenz von Thymidin-Nucleotiden, lagern sich komplementär zum Poly(A)-Schwanz an die RNA-Matrize an. Diese dienen als Primer in der folgenden Elongation der RT. Die random primer sind hexa- oder heptamer-Sequenzen aus zufällig angeordneten

Nucleotiden und dienen ebenfalls als Ansatzpunkte in der folgenden Elongation der RT. Nach Abschluss der reversen Transkription wird die reverse Transkriptase denaturiert und damit inaktiviert. Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgte nach dem Standardprotokoll des Forschungslabors der Kinderheilkunde 1.

#### *DNase I Reaktion*

Abhängig von der Ausgangskonzentration wird die RNA auf eine Zielkonzentration verdünnt (500 ng/ $\mu$ l im Cortex und in den Hemisphären) und die Proben als Duplikate auf 8er-Strips (Bio-Budget) verteilt. Aus folgenden Ingredienzien wurde ein Reaktionsmix hergestellt:

1  $\mu$ l 10x DNase I Reaction Buffer

1  $\mu$ l DNase (1U/ml)

6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Anschließend wurden jeweils 8  $\mu$ l des Reaktionsmix zu 2  $\mu$ l RNA hinzugefügt und die Proben zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die DNase I durch Zugabe von 1  $\mu$ l 25 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies) sowie Inkubation für 10 min bei 65°C im Thermocycler (Biometra T3 Thermocycler) inaktiviert.

#### *RT Reaktion I*

Zu 5  $\mu$ l des Edukts aus der DNase I Reaktion wurde ein Reaktionsmix aus

1  $\mu$ l Oligo dT (500 ng/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l random primer (250 ng/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l 10mM dNTP

2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

hinzugefügt und die Gemische kurz zentrifugiert. Danach wurden die Proben bei 65°C für 5 min inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA zu erhalten. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und jeweils 10  $\mu$ l des Reaktionsmix für die endgültige Reverse Transkription zugefügt:

- 4 µl 5x First Strand Buffer
- 2 µl 0,1M DTT
- 1 µl Superscript II (200U/µl)
- 3µl H<sub>2</sub>O

Die Proben wurden zentrifugiert, schließlich im Thermocycler 60 min bei 42°C für die Transkription inkubiert, die Reaktion durch Erhöhen der Temperatur auf 70°C für 15 min gestoppt, die synthetisierte cDNA auf 4°C abgekühlt und bei -20°C gelagert.

### 3.4.6 REALTIME PCR

Die Realtime PCR (qPCR) ist eine Sonderform der Polymerasekettenreaktion (PCR). In ihrem Kern funktioniert sie genauso wie eine herkömmliche PCR.

Ein maßgeblicher Unterschied zur gewöhnlichen PCR ist, dass bei der qPCR in Echtzeit die Menge des amplifizierten DNA-Abschnittes semi-quantifiziert werden kann. Man kann mit dieser Methode direkt den Zyklus ablesen, in der die in der Probe vorhandene DNA-Menge einen zuvor definierten Schwellenwert überschreitet (Ct-Wert; *threshold cycle*). Dieser Schwellenwert wird im Bereich des exponentiellen Wachstums gewählt. Jedes Gen hat einen individuellen Ct-Wert, der sich nach dem zuvor erwähnten Wachstumsverhalten ableiten lässt. Die qPCR benötigt keine aufwendige Endpunkt-Mengenbestimmung wie bei der herkömmlichen PCR mehr, sondern stellt bei ihrer Auswertung eine (semi-) quantitative Methode dar. Bei dieser Arbeit wurde Ubiquitin C als Haushaltsgen verwendet. Haushaltsgene sind Gene, die möglichst unabhängig von äußeren Faktoren exprimiert werden, um im Vergleich die Expression der zu untersuchenden Gene zu normalisieren.

Es werden unterschiedliche Detektions-Methoden genutzt, wobei grundlegend eine spektroskopisch detektierbare Reaktion gemessen wird; bei der hier verwendeten qPCR wird entweder ein fluoreszierendes Molekül (hier: SYBR Green®), oder eine FRET-Sonde (TaqMan®) genutzt.

Bei der Verwendung von SYBR Green® bindet sich dieses an die sich bildenden DNA-Doppelstränge und interkaliert zwischen den Basen, es entsteht ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex. Die Fluoreszenz steigt direkt proportional mit der

Zunahme der doppelsträngigen DNA (des PCR-Produkts), weshalb die Messungen zum Ende der Elongationsphasen der Zyklen stattfinden. SYBR Green® bindet Doppelstrang-DNA unspezifisch sodass nicht nur Fluoreszenz aufgrund der Bindung an das gewünschte PCR-Produkt gemessen wird, sondern auch unspezifische Produkte, unter anderem Primer-Paarungen. Zudem kann SYBR GREEN® an Einzelstrang-DNA und auch RNA binden, hier ist das Fluoreszenzsignal aber deutlich geringer.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von sogenannten Sonden. Es gibt unterschiedlichste Sonden, die alle auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) beruhen. Bei sogenannten FRET-Sonden (hier: TaqMan) verhält es sich so, dass es aufgrund des Förster-Resonanzenergietransfers zu einer Interaktion zwischen Reporter und Quencher kommt. Diese Interaktion beruht auf der Energieübertragung des Reporters auf den Quencher, sodass es zu keiner Fluoreszenz kommt. Die Fluoreszenz tritt erst auf, wenn Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt werden. Diese Trennung der beiden Sondenteile wird im Fall der TaqMan-Sonde durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der PCR-internen DNA-Polymerase vollzogen. TaqMan-Sonden sind so gestaltet, dass sie eine spezifische Sequenz besitzen, welche sich in der Annealing-Phase der PCR an das entsprechende DNA-Template anlagern. Im Verlauf der Elongation des komplementären DNA-Strangs spaltet die 5'-3'- Exonukleaseaktivität den Reporter von der TaqMan-Sonde ab, sodass das FRET-Prinzip unterbunden wird und der Reporter fluoreszieren kann. Diese Fluoreszenz des Reportermoleküls wird spektroskopisch detektiert und ist aufgrund der Sequenzspezifität genauer als die Messung mit reinen Fluoreszenzfarbstoffen, die an die DNA interkalieren. Auch hier ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur DNA-Menge.

#### 3.4.6.1 EFFIZIENZTESTUNG DER PRIMER

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz der verwendeten Primer wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe (pure cDNA, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) angelegt und mit den ausgewählten Primern Axin2, beta-Catenin, Traf6, MyD88 und Ticam2 qPCRs in einem Ansatz durchgeführt. Die gemessenen Ct-Werte wurden gegen die logarithmischen Werten der einzelnen Verdünnungen aufgetragen. Anhand dieser Punkte konnte eine Regressionsgerade ermittelt werden, deren Steigung (m) die Effizienz der PCR angibt. Folgende Formel wurde verwendet:  $E = 10^{1/m} - 1$ . Durch exemplarisches Einsetzen von

den Werten der Testung des Axin2 erhält man eine Effizienz für die Primer von  $E \cong 0,9923487 = 0,9924$ . Insgesamt wurden Effizienzen im Intervall von 0,95 bis 1,05 akzeptiert.

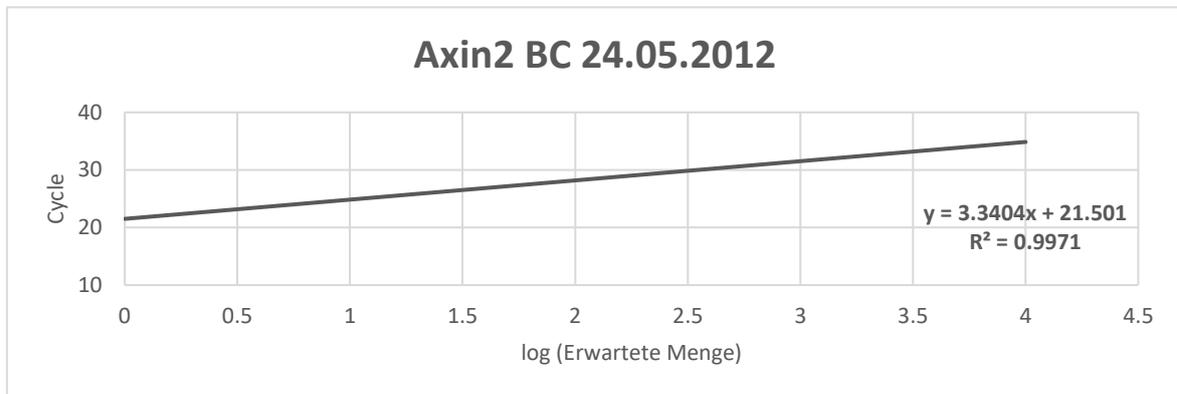


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Effizienztestung für Axin2

#### 3.4.6.2 DURCHFÜHRUNG DER REAL TIME PCR

Die Real Time Polymerasekettenreaktionen (qPCR) wurden alle am StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

Die qPCR wurde für die Gene CEACAM1- 4C2, Axin2, Beta-Catenin, MyD88, Ticam 2, Traf 6 mit Primer-Probe-Sets (BioTeZ Berlin Buch GmbH) und dem Referenzgen Ubiquitin C mit SYBR Green® (SYBR-Green® PCR Mastermix (2x), Thermo Fisher Scientific) ausgeführt. Für die Amplifikation der membranständigen CEACAM1 Isotypen -L und -S wurden Primer-Probe-Sets (BioTeZ Berlin Buch GmbH) und TaqMan® Reagenz (TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet; als Referenzgen wurde auch hier Ubiquitin C genutzt.

Aufgrund einer geringeren Menge an exprimiertem CEACAM1 im Vergleich zu den weiteren Genen wurden die Proben für CEACAM1 1:1 und für die weiteren Gene 1:4 verdünnt. Die einzelnen Proben wurden stets als Dupletts aufgetragen, für das weitere Vorgehen wurde das arithmetische Mittel der Ct-Werte benutzt. Bei einer Standardabweichung der Ct-Werte  $> 0,4$  wurden die Proben ausgeschlossen.

Für jedes Gen wurden die Versuche zweimal durchgeführt.

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen (pro Reaktionskammer):

Ingredienzien	Pro Reaktion	Für x Reaktionen
SYBR Green®	10µl	x x 10µl
Primer	1µl	x x 1µl
H <sub>2</sub> O (Hemisphäre und Cortex)	7µl	x x 7µl

Tabelle 9: SYBR Green®-Mastermix, verwendet für folgende Gene: Axin2, Beta-Catenin, CEACAM1 -4C2, MyD88, Ticam2, Traf6 und Referenzgen Ubiquitin C

Ingredienzien	Pro Reaktion	Für x Reaktionen
TaqMan® Reagenz	10 µl	x x 10 µl
CEACAM1 -L/-S Probe	2 µl	x x 2 µl
Primer	3,6 µl	x x 3,6 µl
H <sub>2</sub> O	0,4 µl	x x 0,4 µl

Tabelle 10: TaqMan®-Mastermix, verwendet für folgende Gene: CEACAM1-L und CEACAM1-S

Die cDNA für die zu untersuchenden Gene wurde in Dupletts auf eine Mikrotiterplatte (96-well) aufgetragen. Bei einer Gewebekonzentration von 500 ng/µl im Cortex bzw. in der Hemisphäre wurden 2 µl der cDNA verwendet. Je nach verwendeter cDNA-Menge müssen unterschiedliche Volumina H<sub>2</sub>O hinzupipetiert werden, um auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zu kommen. Mittels der Multipette® (Eppendorf) wurden 18 µl (Gene: Axin2, Beta-Catenin, CEACAM1-4C2, MyD88, Ticam2, Traf6 und Referenzgen Ubiquitin C) bzw. 16 µl (Gene CEACAM1-L, CEACAM1-S) des zuvor hergestellten Mastermix zu den Proben hinzugefügt, sodass die Summe pro Reaktionskammer schließlich 20 µl ergab.

Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) versiegelt. Nach Zentrifugation der Mikrotiterplatte für 2 min bei 3000 x g erfolgte die qPCR am StepOnePlus Real Time PCR System nach dem Protokoll des Herstellers beginnend bei 95°C für 20 s und anschließend 40 Zyklen von abwechselnd 3 s bei 95°C und 30 s bei 67°C.

## **3.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN**

### **3.5.1 ANLEGEN UND KULTIVIERUNG EINER GLIA-MISCHKULTUR**

Entsprechend der Anzahl von Präparaten wurden Zellkulturflaschen mit 10 ml GliaMix-Medium (GMM) befüllt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 1-2 Stunden im Brutschrank gelagert. Für den Erhalt primärer Oligodendrozyten, muss eine Glia-Mischkultur angesetzt werden. Hierfür wurden ein bis zwei Tage alte Sprague Dawley Ratten verwendet. Nach Dekapitation von Jungtieren und sagittaler Eröffnung der Kalotten wurden die gesamten Gehirne vorsichtig mit dem Cerebellum entnommen und in eine mit eisgekühlter PBS gefüllter Petrischale (Ø 10 cm) überführt. Anschließend wurden äußere und innere Meningen entfernt, die Cortices von den Cerebelli abgetrennt, sowie die Cortices mittig gespalten. Jeweils wurden 2 Gesamtgehirne ohne Cerebellum in ein mit gekühltem GMM gefüllten 15 ml Tube überführt, unter sterilen Bedingungen bei RT mechanisch mittels Pasteur-Pipetten bis zum Erhalt eines Homogenats aufgeschlossen wurde. Anschließend wurde 8 min bei 800 x g bei RT zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet ausbildete. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 5 ml/Gehirn vorgewärmten GMM resuspendiert. Als letztes wurden 10 ml der Suspension (entsprechen 2 Gesamtgehirne ohne Cerebellum) in die zuvor vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt.

Das Gesamtvolumen der Zellkulturflaschen betrug 20 ml und diese wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für mindestens 4 Tage ohne jegliche Bewegung bebrütet. In diesem Zeitraum sterben die Neuronen ab, wobei sich ein Astrozyten-Rasen auf der unbeschichteten Oberfläche der Flaschen über einen Zeitraum von 10-12 Tagen ausbildet. Auf diesem Rasen heften und wachsen wiederum Mikroglia und Oligodendrozyten. Nach den ersten 4 Tagen im Brutschrank wurde ein Medienwechsel durchgeführt; hierfür wurde das anfängliche Medium verworfen und durch frisch, vorgewärmtes GMM ersetzt. Dieser Austausch fand alle 2 Tage statt, bis sich der konfluente Astrozytenrasen ausgebildet hatte (10-12 Tage), auf dem eine Population von Oligodendrozyten und Mikroglia zu sehen war.

### **3.5.2 ISOLIERUNG DER OLIGODENDROZYTEN**

Nach einer Vorkultivierung der Gliamischkultur wurden die Oligodendrozyten durch einen zweistufigen Schüttelprozess isoliert. Im ersten Schritt wurden die Zellen bei 230 rpm für 1 h im Brutschrank geschüttelt. Die abgelöste Mikrogliafraktion wurde verworfen und die Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml frischem vorgewärmten GMM versetzt. In einem

zweiten Schüttelschritt bei 200 rpm bei 37°C über 16-18 h wurden die Oligodendrozyten vom Astrozytenrasen gelöst. Jeweils 10 ml des Oligodendrozyten-Überstandes wurde auf Petrischalen überführt und für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, damit die nach dem zweiten Schüttelschritt noch verbliebenen Astrozyten auf dem Boden der Petrischale haften. Der gesamte Zellüberstand wurde letztlich durch 15 µm Siebe passiert sowie bei 800 x g für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet im Proliferationsmedium (PM; Abschnitt 3.1.2.6) resuspendiert. Die Oligodendrozyten wurden mittels der Neubauerzählkammer ausgezählt.

### **3.5.3 HERSTELLUNG POLY-L-ORNITHIN BESCHICHTETER PLATTEN**

Nach Isolierung und Kultivierung der Oligodendrozyten wurden diese auf 24-Well Platten ausgesät. Vor diesem Schritt wurden Poly-L-Ornithin beschichtete Platten vorbereitet, damit eine bessere Haftung der Oligodendrozyten gewährleistet ist. Hierfür wurde 500 µl Poly-L-Ornithin-Lösung (5 µg/ml) pro Well in ein 24er-Well mit zusätzlichen Deckgläschen am Boden hinzugegeben und über Nacht bei RT unter der Sterilbank inkubiert. Die Deckgläschen wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet, bis zum weiteren Gebrauch wurden diese bei RT steril gelagert.

### **3.5.4 KULTIVIERUNG DER ZELLEN**

Mit einer Dichte von 50 000 Zellen /ml wurden die gereinigten Oligodendrozyten auf mit Poly-L-Ornithin beschichteten Deckgläschen bzw. 24-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden in einem PM kultiviert.

### **3.5.5 SUBKULTIVIERUNG DER ZELLEN**

Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden die Oligodendrozyten auf ein Differenzierungsmedium (DM; Abschnitt 3.1.2.6) umgesetzt. Die Zellen wurden nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h für 20 min in 2%iger PFA - Lösung fixiert und nach drei Waschschritten mit 300 ml PBS pro Well bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 3.5.6 IMMUNZYTOCHEMISCHES PROTOKOLL FÜR CEACAM-1, MBP, O1 UND O4

Die Immunzytochemie wurde nach einem Standardprotokoll des Forschungslabors der Kinderheilkunde 1 durchgeführt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper können *Tabelle 5* entnommen werden.

*Tag 1:*

1. Spülen mit 300 µl PBS pro Well für 10 min
2. Blockieren mit 3% NGS/PBS für 60 min, pro Well werden 500 µl benötigt
3. Primärer CEACAM1 - Antikörper in einer Verdünnung von 2 µg/ml, MBP, O1 und O4 Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 3% NGS/PBS - Blockpuffer über Nacht bei 4°C, pro Well werden 250 µl benötigt

*Tag 2:*

4. Spülen mit 300 µl PBS für 5 min, um die nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Anschließend weitere 3 mal Spülen mit 300 µl PBS/ Well für jeweils 10 min
5. Sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 3% NGS/PBS für 60 min. Die Inkubation erfolgt in einem abgedunkelten Raum.
6. Spülen mit 300 µl PBS für 5 min, um die nicht gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Anschließend weitere 3 mal Spülen mit 300 µl PBS/ Well für jeweils 10 min
7. Gegenfärben mit 250 µl PBS-DAPI für 5 min
8. Spülen mit 300 µl PBS für 5 min
9. Deckgläschen vorsichtig aus der 24-Well-Platte heben und luftblasenfrei eindecken mit Dako Fluorescent Mounting Medium

Zur Detektion von CEACAM1 wird Alexa Fluor 594-konjugierter Sekundärantikörper und zur Detektion von MBP und den Oligodendrozytenmarkern O1 und O4 dient ein Alexa Fluor 488-konjugierter Sekundärantikörper.

### 3.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Daten wurden mit Microsoft Excel tabellarisch erfasst und mit der Statistiksoftware R (*The R Foundation for Statistical Computing, Version 3.4.3 vom 30.11.2017, Wien*) analysiert und anschließend graphisch visualisiert. Die Ergebnisse wurden als Balkendiagramme mit Standardfehler dargestellt. Anhand des Standardfehlers lassen sich statistisch signifikante Zusammenhänge leichter nachvollziehen. Bei Überschneidung der Fehlerbalken liegen keine statistisch signifikanten Abweichungen ( $p > 0,05$ ) der Mittelwerte vor; bei nicht-Überschneidung liegt nicht zwangsläufig eine Signifikanz vor. Es wurde zur Auswertung der Daten der Genexpression zur Überprüfung einer Normalverteilung keine Testung durchgeführt, da es aufgrund des Versuchsdesigns zu keiner ausreichenden Aussagekraft käme. Die Versuchsgruppen waren ursprünglich größer geplant, es konnten aber aufgrund von methodischen Problemen einige Versuchsreihen und einzelne Ergebnisse übernommener Versuchsreihen nicht in die Wertung mit einfließen. Nach Überprüfung der Varianzhomogenität durch den Levene-Test erfolgte je nach Ergebnis die Analyse mittels Standard-ANOVA oder Welch's ANOVA. Sowohl die Standard-ANOVA als auch die Welch's ANOVA sind für nicht-normal-verteilte Populationen robust, sodass für diese Versuchsreihe diese Testverfahren genutzt werden konnten (Lix et al., 1996). Bei signifikantem Ergebnis in der ANOVA erfolgte eine post-hoc-Analyse. Die post-hoc-Analyse der Therapiegruppen untereinander erfolgte bei Heteroskedastizität mit dem Wilcoxon-Test, bei Homoskedastizität mit dem Tukey's HSD (honest significant difference) - Test. Als statistisch signifikant gelten p-Werte  $< 0,05$ .

### 3.7 BILDBEARBEITUNGS SOFTWARE

Zur Bearbeitung von Bildern und Graphiken wurden folgende Programme genutzt:

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
ChemDraw 20.0	PerkinElmer Informatics Inc.	Darstellung von Signalwegen und der CEACAM1-Isoformen
GIMP 2.10.30	The GIMP Development Team	Bildbearbeitung
ImageJ	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health	Erstellen der Skalierungsbalken
Inkscape 1.1.2	Inkscape Project	Erstellen der Darstellung der Schnittebenen im Rattenhirn

Tabelle 11: Tabellarische Auflistung der genutzten Bildbearbeitungssoftware

## 4 ERGEBNISSE

---

### 4.1 KOLOKALISATION VON CEACAM1 MIT MYELINISIERENDEN STRUKTUREN AN P11

CEACAM1 wird im sich entwickelnden Rattenhirn auf Oligodendrozyten exprimiert. Es besteht ein spatiotemporaler Zusammenhang zur Myelinisierung (Prager et al., 2013).

Die immunhistochemische Analyse der Veränderung der CEACAM1-Expression im Rahmen der Frühgeborenen-Hirnschädigung erfolgte an Gehirnen von 11 Tage (p11) alten Wistar-Ratten (n=5-6 je Schadensgruppe). Diese waren entsprechend dem zuvor beschriebenen Schädigungsmodell der hyperoxie- und inflammationsinduzierten Frühgeborenenhirnschädigung behandelt worden. Zur Analyse wurden Coronarschnitte zweier definierter Ebenen verwendet (s. *Abb. 6 Paxinos & Watson The Rat Brain Atlas, 2007*). Die Auswahl der Ebenen erfolgte aufgrund der bisherigen Ergebnisse der spatiotemporalen CEACAM1-Expression.

An p11 lassen sich CEACAM1-positive Strukturen in den ausgewählten Ebenen (s. *Abb. 6 Paxinos & Watson The Rat Brain Atlas, 2007*) darstellen. Positive Strukturen sind entlang der Capsula interna und Capsula externa sowohl in der Kontrollgruppe (NO/NaCl), als auch in allen Schadensgruppen (NO/LPS, HO/NaCl, HO/LPS) lokalisierbar (*Abb. 9*). Eine Änderung der CEACAM1-Expression im Rahmen des Schädigungsmodells ist immunhistochemisch nicht detektierbar.

Die bereits bekannte Expression des CEACAM1 auf Oligodendrozyten konnte durch die Doppelfärbung mit MBP, einem Marker für Myelinscheiden neuronaler Zellen, immunhistochemisch verifiziert und an p11 in allen untersuchten Ebenen bestätigt werden (*Abb. 10 und 11*). CEACAM1 positive Strukturen an p11 weisen eine faserartige Morphologie auf. In der ausgewählten Region des Mesencephalons (*Abb. 11*) dominiert die Expression des CEACAM1 in den ventralen Abschnitten. Die Fasern verlaufen bevorzugt ventral des aquaeductus mesencephali und zwischen pontinen Kernen.

CEACAM1 positive, jedoch MBP negative Fasern lassen sich hier ebenfalls darstellen. Auch an der Kreuzung (Decussatio) der Capsula interna und externa im Frontalhirn (*Abb. 10*) präsentieren sich CEACAM1 positive Strukturen faserartig und verlaufen geordnet

innerhalb der Capsula interna (IC) oder Capsula externa (EC), während sich einige positive CEACAM1 Fasern von diesen Leitungsbahnen abspalten.

Zwischen den einzelnen Therapiegruppen (A= NO/NaCl, B= NO/LPS, C= HO/NaCl, D= HO/LPS) lassen sich immunhistochemisch keine eindeutigen Veränderungen im Expressionsmuster des CEACAM1 und der myelinisierenden Strukturen zu diesem Zeitpunkt nachweisen.

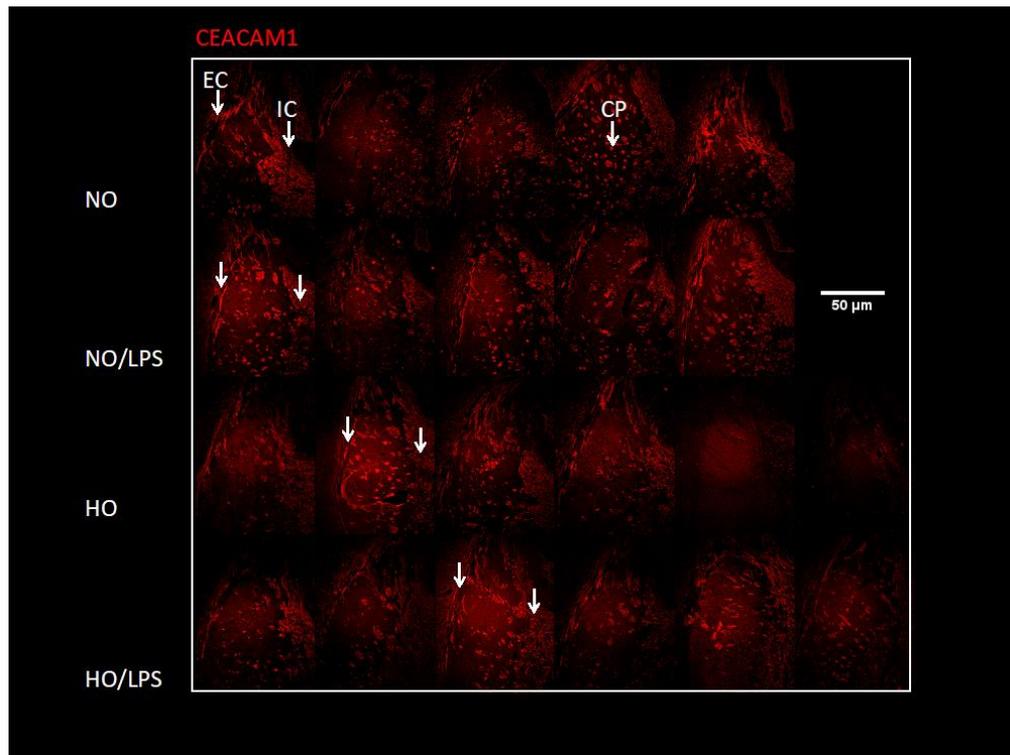


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von CEACAM1 (rot) an p11 in 20x Vergrößerung. Abgebildet wird ein Ausschnitt eines Coronarschnitts (Bregma -2,76 nach Paxinos & Watson The Rat Brain Atlas). Es werden je Schadensgruppe 5-6 Tiere dargestellt. Von oben nach unten sind die Schadensgruppen Normoxie (NO), NO mit LPS (NO/LPS), Hyperoxie ohne LPS (HO) und HO mit LPS (HO/LPS) aufgeführt. CEACAM1 positive Strukturen zeigen sich an Capsula interna (IC), Capsula externa (EC) sowie Caudatoputamen (CP). Weitere CEACAM1 positive Strukturen werden durch Pfeile gekennzeichnet. Es lassen sich keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Schadensgruppen nachweisen.

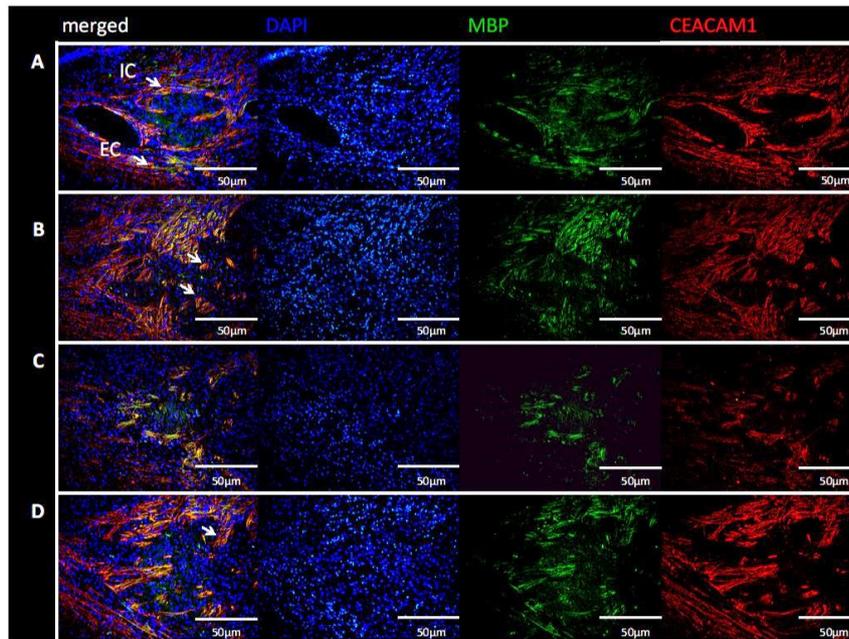


Abbildung 10: Immunhistochemische Kofärbung von CEACAM1 (rot) und MBP (grün), einem Marker für myelinisierte Oligodendrozyten, an p11 in 20x Vergrößerung. Ausgewählt wurden Coronarschnitte auf Ebene des Hippocampus Bregma -2,76 mm nach Paxinos & Watson The Rat Brain. Die Abbildungen A-D präsentieren das Expressionsmuster des CEACAM1 innerhalb der vier Therapiegruppen. Es ist jeweils exemplarisch ein Tier pro Schadensgruppe dargestellt. (A) NO ohne LPS (B) NO mit LPS (C) Hyperoxie ohne LPS (D) Hyperoxie mit LPS. Die Kofärbung (gelb) von CEACAM1 (rot) und MBP (grün) im Frontalhirn an der Capsula interna (IC) und Capsula externa (EC) wird bestätigt. Zellkerne werden durch DAPI-Färbung blau dargestellt. Innerhalb der vier ausgewählten Therapiegruppen lässt sich kein Unterschied im Expressionsmuster erkennen.

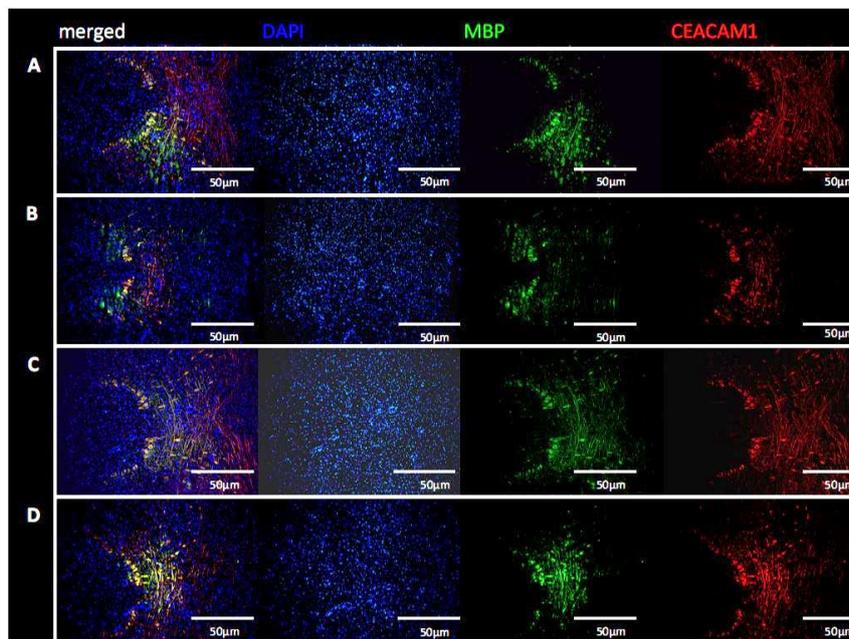


Abbildung 11: Immunhistochemische Kofärbung von CEACAM1 (rot) und MBP (grün), einem Marker für myelinisierte Oligodendrozyten, an p11 in 40x Vergrößerung. Ausgewählt wurden Coronarschnitte auf Ebene des Mesencephalons Bregma -6,84 mm nach Paxinos & Watson The Rat Brain. Zellkerne werden durch DAPI-Färbung blau dargestellt. Die Abbildungen A-D präsentieren das Expressionsmuster des CEACAM1 innerhalb der vier Therapiegruppen. Es ist jeweils exemplarisch ein Tier pro Schadensgruppe dargestellt. (A) NO ohne LPS (B) NO mit LPS (C) Hyperoxie ohne LPS (D) Hyperoxie mit LPS. Die bereits bekannte Koexpression des CEACAM1 mit myelinisierenden Fasern (gelb) an p11 wird bestätigt. Innerhalb der vier ausgewählten Therapiegruppen lässt sich kein Unterschied im Expressionsmuster erkennen.

## 4.2 EXPRESSION DES CEACAM1 AUF PRIMÄREN OLIGODENDROZYTENKULTUREN

Zur Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse *in vitro* wurden primäre Oligodendrozyten – Kulturen angelegt.

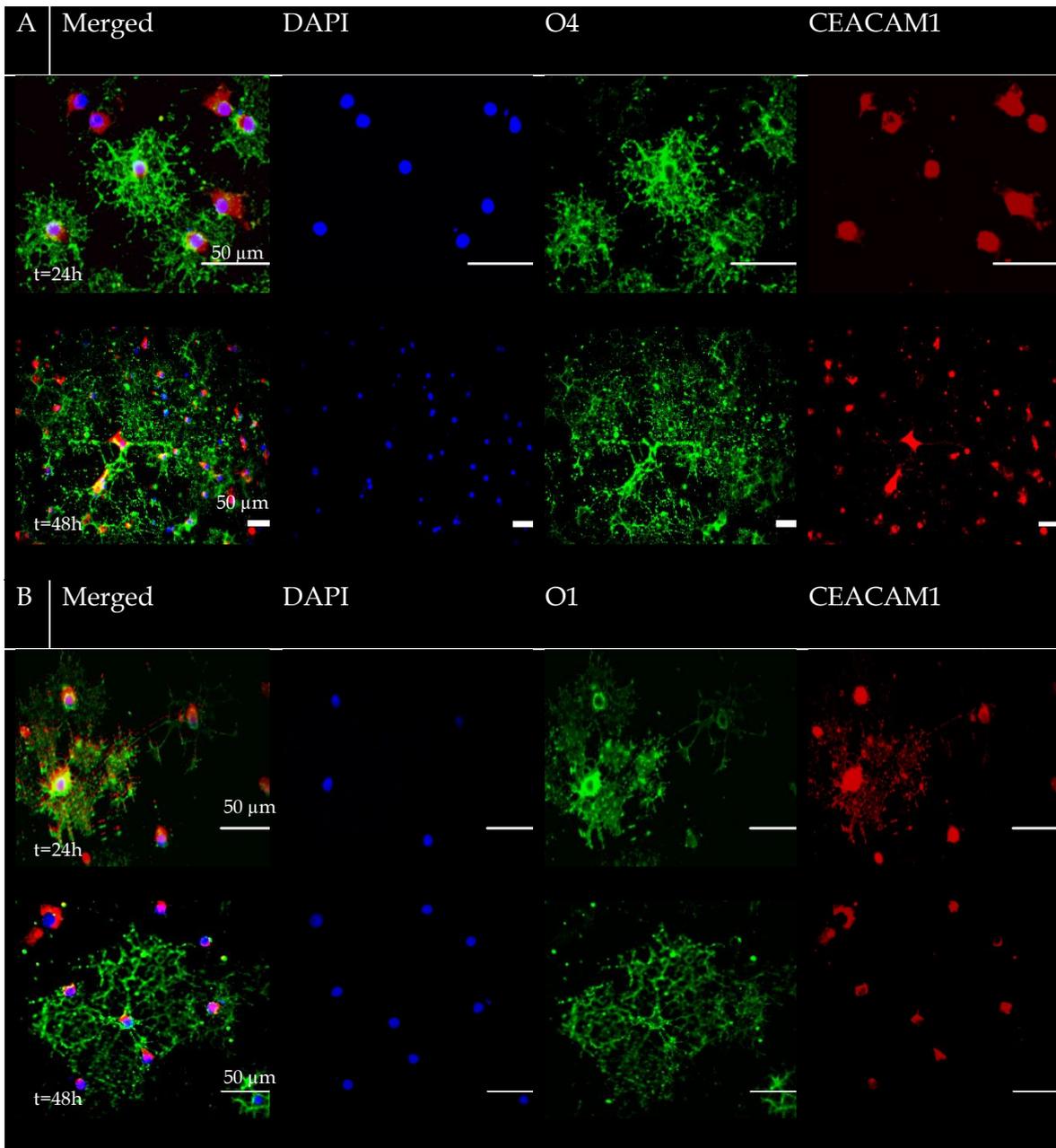
Die in Abbildung 12 dargestellten Oligodendrozytenkulturen zeigen Aufnahmen zu drei Zeitpunkten (24h, 48h und 72h), die mit unterschiedlichen Markern zur Untersuchung der Entwicklungsstufen und der Myelinisierung gefärbt wurden. Zusätzlich wurde als weiterer Marker CEACAM1 verwendet, um Koexpressionsmuster darzustellen. Ein vierter Zeitpunkt (96h) wurde aus der Analyse und Darstellung der Ergebnisse herausgenommen, da sich über den Zeitpunkt 72h keine Veränderungen mehr darstellen ließen.

In Abbildung 12A wird eine 24- und 48-Stunden kultivierte Probe, die mit O4 und CEACAM1 markiert wurde, abgebildet. Die durch O4 und CEACAM1 detektierten Strukturen sind deutlich zu erkennen. CEACAM1 ist hier im Soma nachzuweisen. Der O4-Marker kennzeichnet auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ausgebildete Strukturen, die auf gereiften Oligodendrozyten weiterhin nachzuweisen sind. Hierbei reagiert der Marker mit dem sulfatierten Glykolipid Pro-Oligodendrozyten-Antigen (POA). In der merged-Projektion sind die jeweiligen Einzel-Marker-Projektionen überlappend dargestellt, sodass mögliche Koexpressionsmuster zur Geltung kommen können. In 12A sind nach 24 Stunden alle O4 positiven Zellen zugleich CEACAM1 positiv, jedoch nicht alle CEACAM1 positiven Zellen auch O4 positiv. CEACAM1 bleibt mit der Differenzierung der Zellen nach 48 Stunden ebenfalls nachweisbar. Vereinzelt CEACAM1-positive Zellen zeigen zum Zeitpunkt t=48h keine Koexpression zu O4.

Bei 12B werden die Kulturen, die mit O1 markiert sind, nach 24 und 48 Stunden Bebrütung dargestellt. O1-Markierung zeigt sich zu beiden Zeitpunkten positiv, wobei der Marker mit einem Galactocerebrosid reagiert, das nur auf Oligodendrozyten vorkommt, die sich im terminalen Differenzierungsprozess befinden. O1 tritt auf unreifen Oligodendrozyten (t=24h) sowohl in Koexpression mit CEACAM1 als auch ohne (t=48h) auf; einige CEACAM1 positive Zellen sind zum Zeitpunkt t=48h nicht mit O1 koexprimiert.

Myelinisierende Strukturen, die durch MBP (Myelin basic protein) markiert sind, werden in Abbildung 12C zu drei verschiedenen Zeitpunkten visualisiert (t=24h, t=48h und t=72h). Bereits nach 24 Stunden ergibt sich ein positiver Nachweis für MBP, der sich über die weiteren Zeitpunkte weiterhin darstellen lässt. Es zeigt eine überwiegende Koexpression

zu CEACAM1 positiven Strukturen. Jedoch sind nicht alle CEACAM1 positiven Zellen MBP positiv.



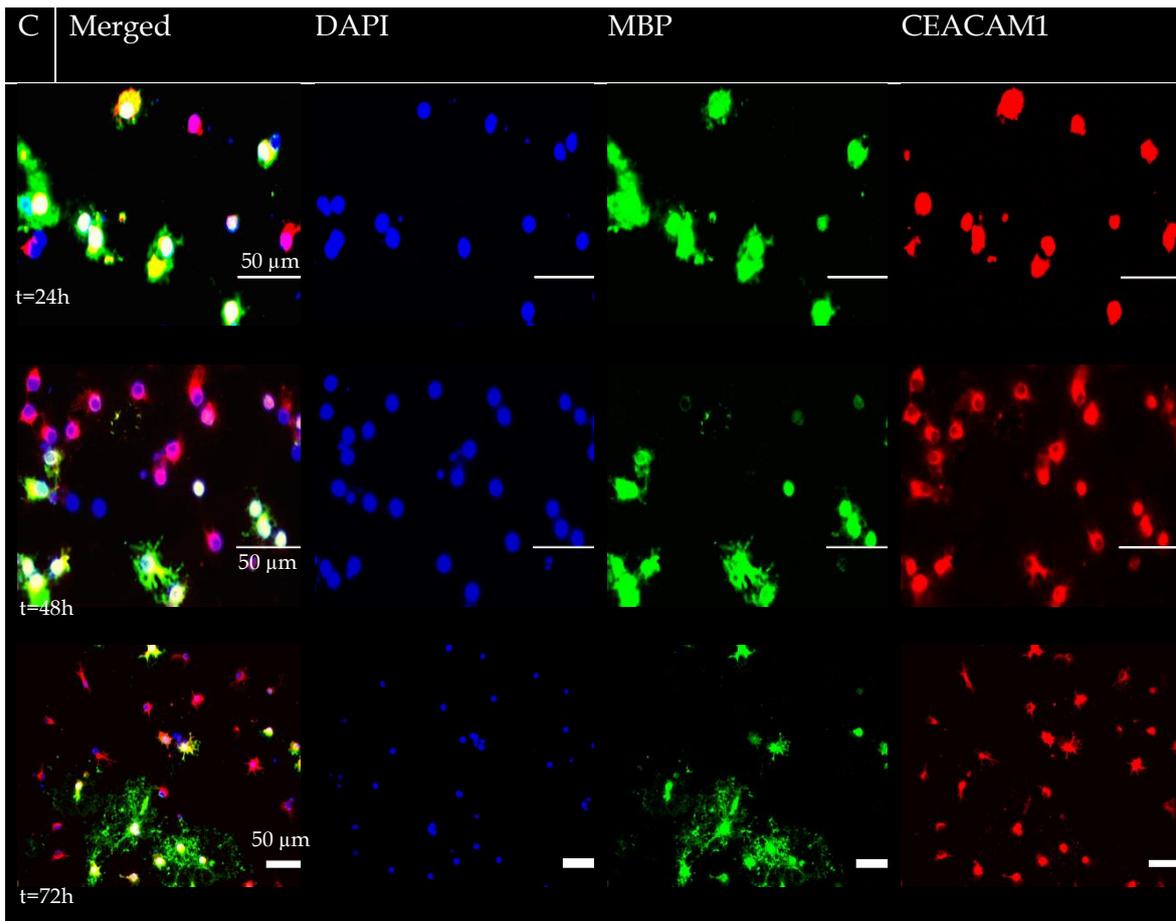


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Färbung von Oligodendrozytenkulturen zu jeweils unterschiedlichen Differenzierungsstadien (24h, 48h und 72h) in 40x Vergrößerung (24h und 48h) sowie 20x Vergrößerung (72h). Dargestellt werden drei verschiedene Kofärbungen zur den Grundfärbungen mit CEACAM1 und DAPI. In A wird der Marker O4, in B der Marker O1 und in C die Färbung mit MBP illustriert. In allen Abbildungen lassen sich zu den jeweiligen Zeitpunkten positive Nachweise der einzelnen Färbungen darstellen.

### 4.3 VERÄNDERUNG DER DNA-EXPRESSION VON CEACAM1, DES WNT- UND TLR2/4-SIGNALWEGS NACH SCHADEN

Nachfolgend werden die Ergebnisse der molekulargenetischen Auswertung der CEACAM1- sowie der Wnt- und TLR2/4-Signalwege dargestellt.

#### 4.3.1 CEACAM1-EXPRESSION

Die genetische Auswertung der CEACAM1-Gene wurde in kompletten Hemisphären und im Cortex zu zwei Zeitpunkten (p6, p11) durchgeführt.

Zunächst werden die vorliegenden Daten von CEACAM1-L ausgewertet.

In der Hemisphäre zeigt sich zum Zeitpunkt p6 keine Regulation bei CEACAM1-L. An p11 exprimieren die Schadensgruppen NO/LPS, HO/NaCl (n=8-9) und HO/LPS (n=7) mehr CEACAM1-L als die NO-Gruppe (n=8). Es liegt im Mittel eine Zunahme von 19% bei der Therapiegruppe NO/LPS, in etwa 24% in der Therapiegruppe HO/LPS und um 25% bei HO/NaCl vor. Die Zunahme der Expression in den Schadensgruppen an p11 stellen sich als signifikant im Vergleich zur Normoxie-Gruppe dar (n=7-9,  $p < 0,001$ ).

Im Cortex sind an p6 die LPS-Schadensgruppen signifikant herunterreguliert (n=6,  $p < 0,04$ ). Zum Zeitpunkt p11 (NO/NaCl: n=6, NO/LPS: n=5, HO/NaCl: n=7, HO/LPS: n=5) sind keine signifikanten Unterschiede mehr vorhanden.

Bei der CEACAM1-S-Isoform (*s. Abb. 14*) sind in den Hemisphären keine signifikanten Veränderungen nachweisbar

Signifikante Unterschiede lassen sich im Cortex zwischen NO/LPS und HO/NaCl an p6 nachweisen (n=6,  $p < 0,01$ ), ohne dass eine der beiden Gruppen eine signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe aufweist.

Die lösliche Isoform CEACAM1-4C2 zeigt eine signifikante Veränderung in der Expression an p6 in der Hemisphäre zwischen NO/NaCl und HO/LPS (jeweils n=10;  $p < 0,01$ ). Dieser Trend setzt sich an p11 nicht fort. Hier zeigt sich eine Signifikanz in der Hemisphäre (p11) zwischen NO/LPS und HO/NaCl (n= 8-9;  $p < 0,004$ ). Im Cortex an p6 liegt eine Signifikanz für CEACAM1-4C2 zwischen der NO/LPS- und der HO/NaCl-Gruppe (n=6;  $p < 0,04$ ) vor.

Aufgrund der analytischen Nachweisschwelle konnte CEACAM1-4C2 im verwendeten Probenmaterial im Cortex an p11 nicht nachgewiesen werden.

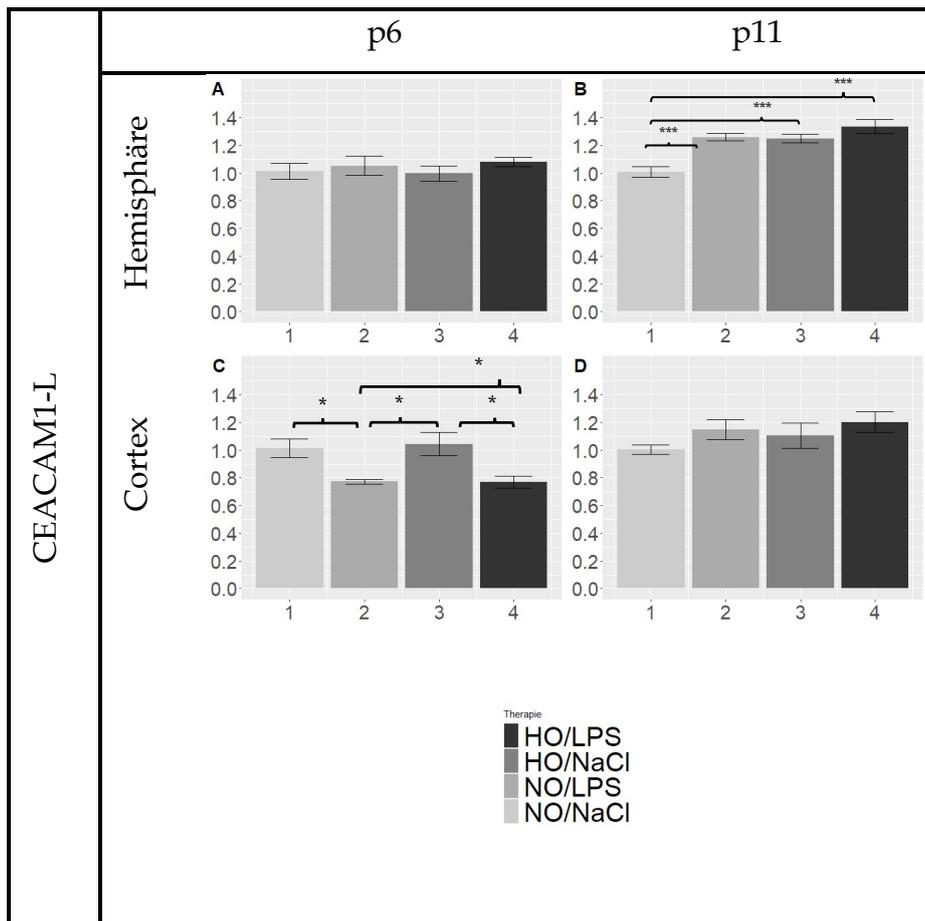


Abbildung 13: Expression der transmembranären CEACAM1-L-Isoform auf RNA-Ebene in Hemisphäre und Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11 im Rahmen des Hyperoxie/LPS-Schadensmodells. Die Analyse erfolgte in den drei Regionen mittels qPCR, als Referenzen wurde Ubiquitin-C verwendet. In der Hemisphäre ist an p6 n=10 in allen Gruppen, an p11 n=7-9, im Cortex an p6 ist n=6 und an p11 n=4-7. Signifikante Veränderungen in der Hemisphäre an p11 sind in allen Schadensgruppen gegeben (n=7-9,  $p < 0,001$ ), während an p6 die LPS-Gruppen im Cortex signifikant herunterreguliert sind (n=6,  $p < 0,04$ ). Die Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey-post-hoc-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Therapiegruppen: 1=NO/NaCl, 2=NO/LPS, 3=HO/NaCl, 4=HO/LPS.

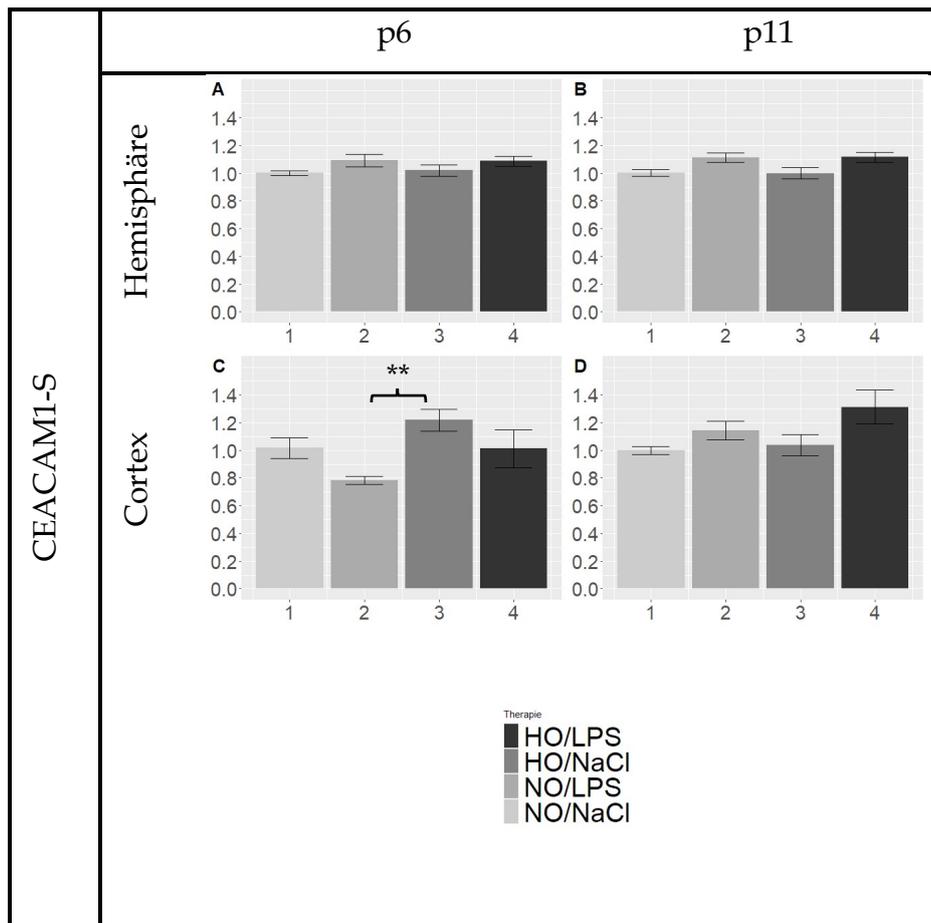


Abbildung 14: Expression der transmembranären CEACAM1-S-Isoform auf RNA-Ebene in Hemisphäre (p6: n=10; p11: n=7-9) und Cortex (p6: n=6, p11: n=4-7) zu den Zeitpunkten p6 und p11 im Rahmen des Hyperoxie/LPS-Schadensmodells. Im Cortex zeigt sich an p6 ein signifikanter Unterschied zwischen der NO/LPS und HO/NaCl-Therapiegruppe (n=6,  $p < 0,01$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Therapiegruppen: 1=NO/NaCl, 2=NO/LPS, 3=HO/NaCl, 4=HO/LPS.

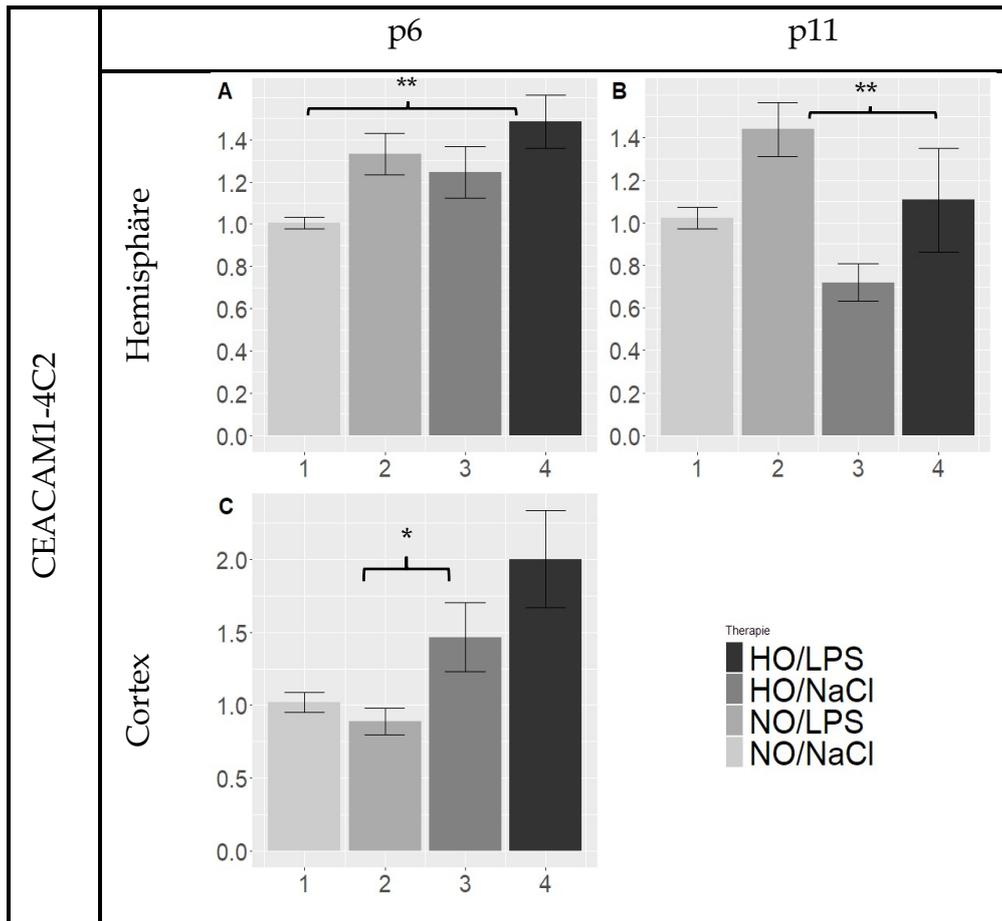


Abbildung 15: Expression der löslichen CEACAM1-4C2-Isoform auf RNA-Ebene in Hemisphäre und Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11 im Rahmen des Hyperoxie/LPS-Schadensmodells. An p6 in der Hemisphäre sind die Therapiegruppen 2-4 der löslichen CEACAM1-4C2-Isoform, welche als Ligand der transmembranären Isoformen fungiert, hochreguliert, die HO/LPS-Gruppe ist sogar signifikant verändert ( $n=10$ ,  $p < 0,01$ ). Die Daten wurden zunächst mit dem Levene-Test auf Homoskedastizität überprüft und bei vorliegender Signifikanz im Anschluss mit der Welch-ANOVA und anschließendem Wilcoxon-ad-hoc-Test analysiert. Im Cortex an p6 liegt eine Signifikanz für CEACAM1-4C2 zwischen NO/LPS- und HO/NaCl-Gruppe vor ( $n=6$ ,  $p < 0,05$ ), an p11 konnte CEACAM1-4C2 nicht mehr nachgewiesen werden. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Therapiegruppen: 1=NO/NaCl, 2=NO/LPS, 3=HO/NaCl, 4=HO/LPS.

#### 4.3.2 WNT-SIGNALWEG: AXIN2 UND BETA-CATENIN

Aufgrund der Ergebnisse der CEACAM1 Expression insbesondere an p6 in den Hemisphären, wurde auf eine Untersuchung des Wnt-Signalwegs an p6 in der Hemisphäre verzichtet.

Für Axin2 lassen sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression in der Hemisphäre an p11 sowie im Cortex zu beiden untersuchten Zeitpunkten nachweisen.

Bei beta-Catenin stellt sich in der Hemisphäre an p11 bei der Schadensgruppe HO/LPS eine signifikante Abnahme im Vergleich zu NO/LPS (n=7,  $p < 0,03$ ) dar, jedoch keine Signifikanz zur Normgruppe.

Im Cortex zeichnen sich für beta-Catenin in den LPS-Schadensgruppen signifikante Unterschiede an p6 (n=6,  $p < 0,03$  für HO/LPS zu HO/NaCl, sowie für NO/LPS zur Kontrollgruppe; n=6,  $p < 0,01$  für NO/LPS zu HO/NaCl), ähnliche Tendenzen liegen zum Zeitpunkt p11 vor. Allerdings lassen sich hier aufgrund der fehlenden Homoskedastizität Signifikanzen nicht nachweisen.

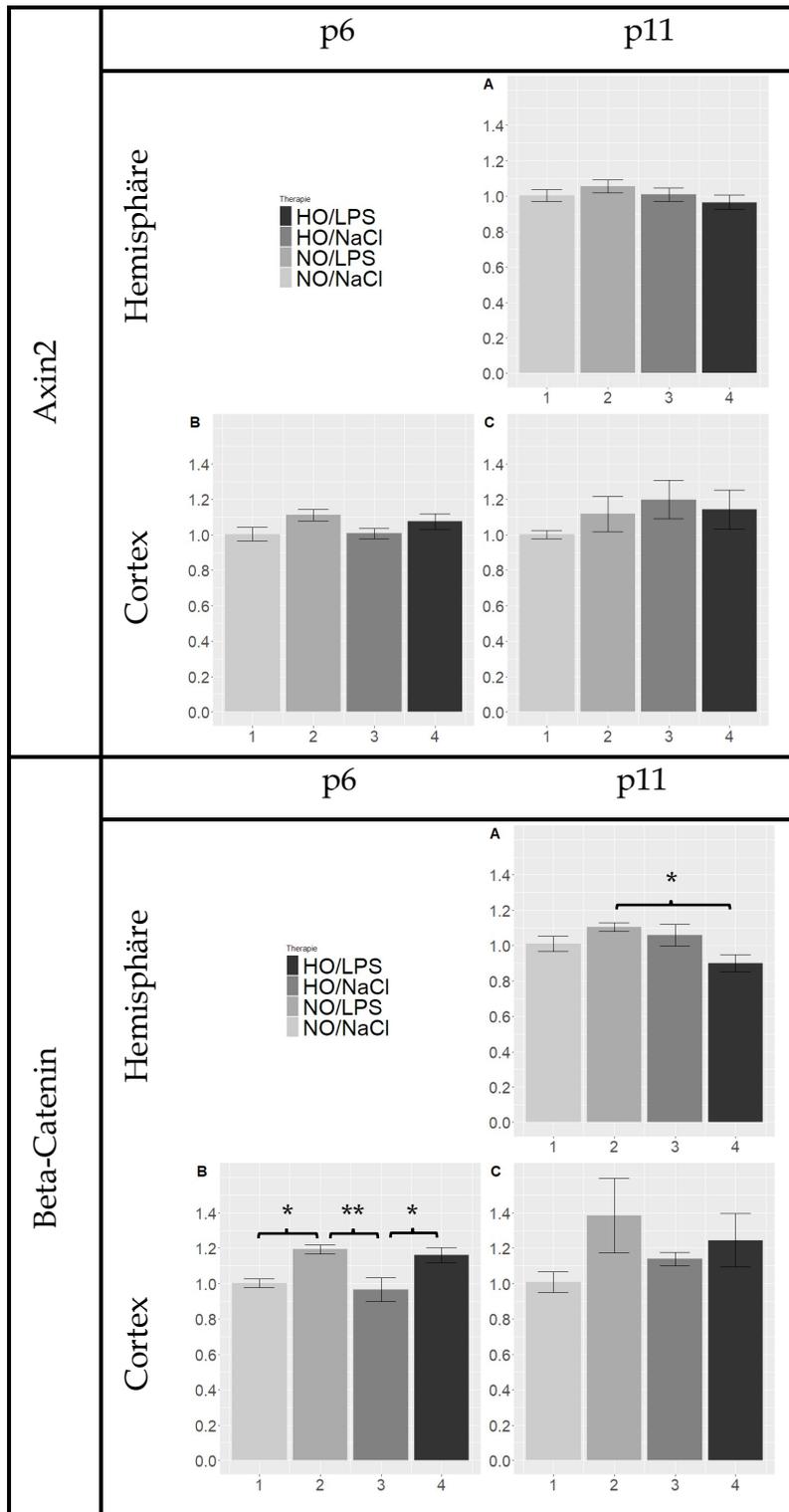


Abbildung 16: Axin2 und beta-Catenin – Analyse der Expression des Wnt-Signalweges auf RNA-Ebene. Dargestellt werden die Analysen in Hemisphäre und Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11. Untersuchungen zu den Wnt-Signalwegen in der Hemisphäre an p6 wurden aufgrund des experimentellen Designs nicht durchgeführt. In der Hemisphäre an p11 stellt sich eine signifikante Abnahme in der HO/LPS-Gruppe beim beta-Catenin ( $n=7$ ,  $p<0,03$ ) zur NO/LPS-Gruppe dar. Im Cortex an p6 sind für beta-Catenin in den LPS-Gruppen signifikante Erhöhungen festzustellen. Dabei sind HO/LPS im Vergleich zu HO/NaCl ( $n=6$ ,  $p<0,03$ ) und NO/LPS sowohl zur Kontrollgruppe ( $n=6$ ,  $p<0,03$ ) als auch zur HO/NaCl-Gruppe ( $n=6$ ,  $p<0,01$ ) signifikant erhöht. Die Daten wurden zunächst mit dem Levene-Test auf Homoskedastizität überprüft. Bei vorliegender Signifikanz im Levene-Test wurde im Anschluss mit der Welch-ANOVA und anschließendem Wilcox-ad-hoc-Test die Werte analysiert. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ . Therapiegruppen: 1=NO/NaCl, 2=NO/LPS, 3=HO/NaCl, 4=HO/LPS.

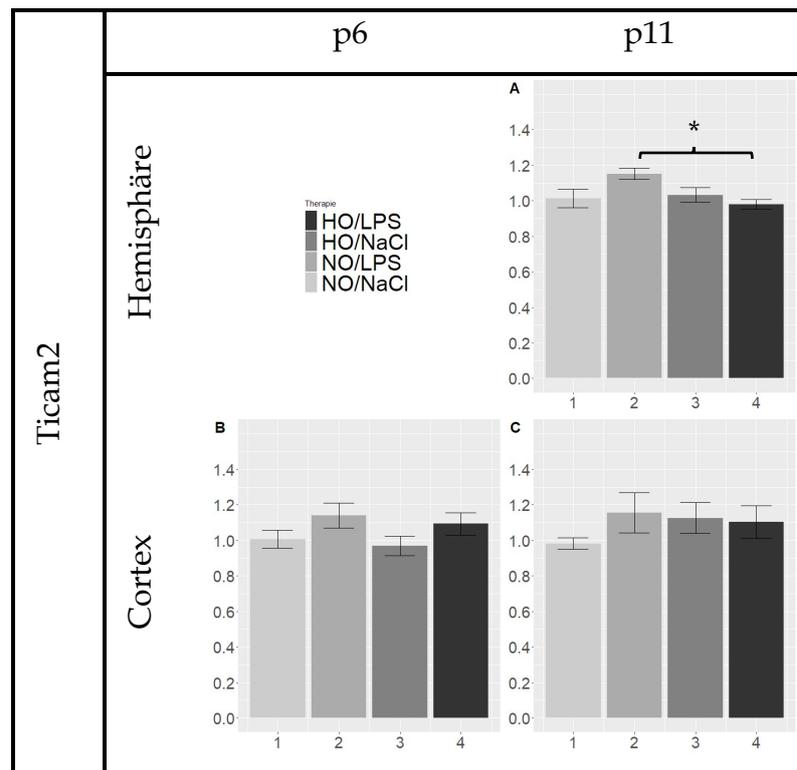
### 4.3.3 TLR2/4-SIGNALWEG: MYD88, TICAM2 UND TRAF6

Ebenfalls, wie beim Wnt-Signalweg, wurden auch beim TLR2/4-Signalweg keine Daten an p6 in der Hemisphäre erhoben.

In der Hemisphäre an p11 (s. Abb. 17) zeigen sich bei MyD88, Ticam2 und Traf6 ähnliche Expressionsmuster. Bei allen ist die Expression in der NO/LPS- signifikant höher zur HO/LPS-Schadensgruppe (n=10, MyD88:  $p < 0,04$ , Ticam2: 0,03, Traf6: 0,005). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe liegen nicht vor.

Im Cortex an p6 und p11 ließen sich für Ticam2 und Traf6 keine signifikanten Veränderungen feststellen. Ausschließlich bei MyD88 lässt sich eine signifikante Erhöhung der Expression an p6 in der Gruppe NO/LPS im Vergleich zu NO/NaCl (n=6,  $p < 0,003$ ) feststellen.

In der Diskussion wird auf die Ergebnisse und deren Bedeutung eingegangen.



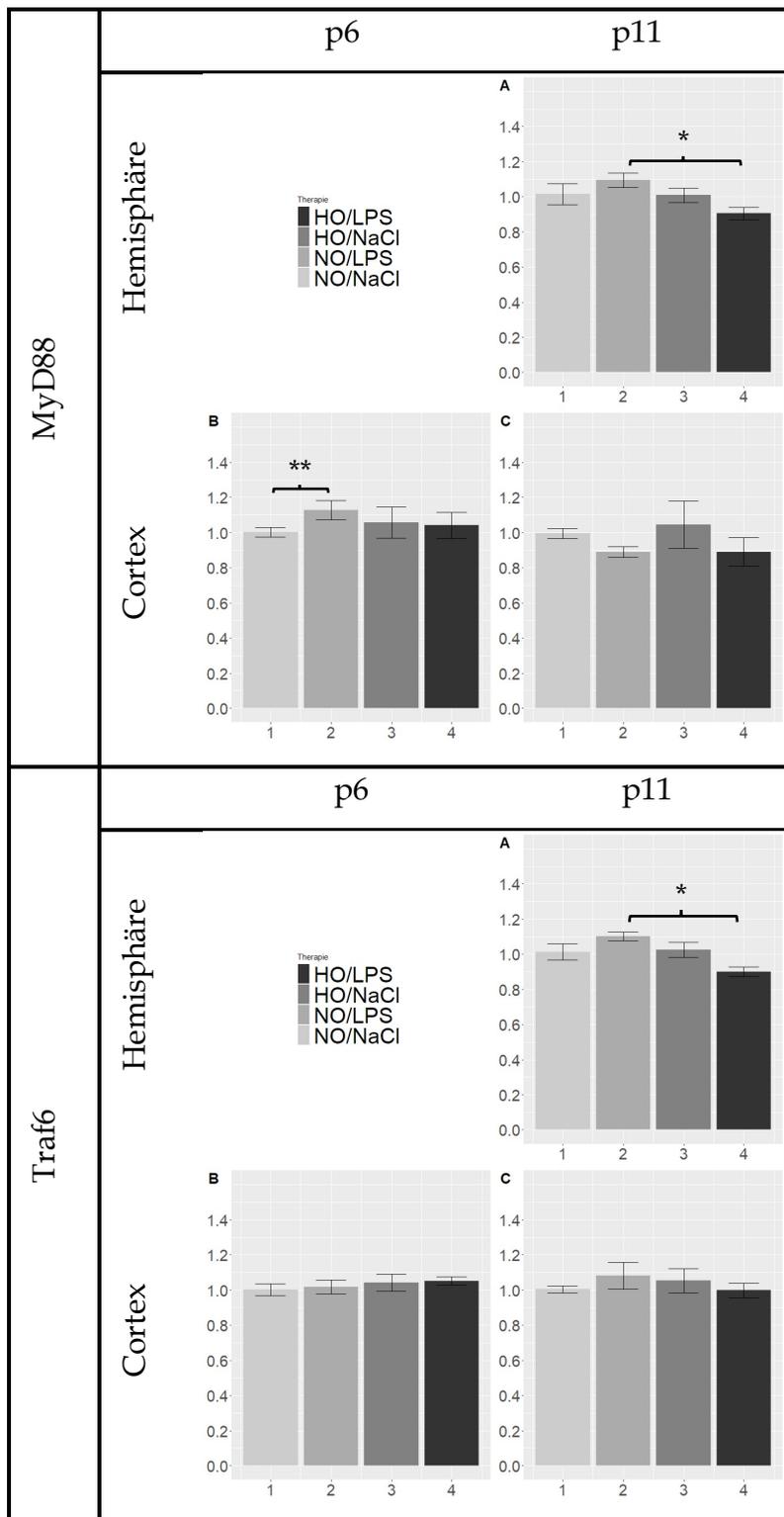


Abbildung 17: MyD88, Ticam2, Traf6 – Analyse der Expression des TLR2- und TLR4-Signalweges auf RNA-Ebene. Die Daten zum Cortex wurden zu den Zeitpunkten p6 und p11 und für die Hemisphäre lediglich an p11 erhoben. In der Hemisphäre an p11 liegt in der HO/LPS-Gruppe eine signifikant geringere Expression von MyD88, Ticam2 und Traf6 im Vergleich zur NO/LPS-Gruppe vor ( $n=10$ , MyD88:  $p<0,04$ , Ticam2:  $p<0,03$ , Traf6:  $p<0,005$ ). Signifikante Veränderungen zur Kontrollgruppe traten nicht auf. Im Cortex an p6 stellt sich bei MyD88 eine signifikant erhöhte Expression in der NO/LPS- im Vergleich zur Normgruppe dar ( $n=6$ ,  $p<0,003$ ). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ . Therapiegruppen 1=NO/NaCl, 2=NO/LPS, 3=HO/NaCl, 4=HO/LPS. Die Daten wurden zunächst mit dem Levene-Test auf Homoskedastizität überprüft. Bei vorliegender Signifikanz im Levene-Test wurde im Anschluss mit der Welch-ANOVA und anschließendem Wilcoxon-ad-hoc-Test die Werte analysiert.

## 5 DISKUSSION

---

Für ein Frühgeborenes gelten besondere Risiken in der weiteren Entwicklung, da sich der Organismus in einer sehr vulnerablen Phase befindet. Während dieser Phase können durch die vorhandene Unreife komplexe Reifungsstörungen auftreten, die langfristige Folgen für die Entwicklung der Organe bedeuten können.

Einen wesentlichen Faktor stellt hierbei die Hirnentwicklung dar. Die *Encephalopathy of prematurity* beschreibt die im Rahmen der Frühgeburtlichkeit auftretenden strukturellen zerebralen Veränderungen, die unter anderem zu einer Hypomyelinisierung führen.

Der allgemeine Mechanismus der Myelinisierung des sich entwickelnden Gehirns ist grundlegend bekannt. Die komplexe Steuerung des Ablaufs der Myelinisierung ist aber nur punktuell bekannt. Allerdings zeigen sich in vielen Punkten noch Lücken, die im Detail aufgeklärt werden müssen.

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des ZNS, welche aus Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC) hervorgehen. Grundlegende Aufgaben von Oligodendrozyten sind die Myelinisierung von Axonen und die Unterstützung der Signalweiterleitung. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass sie vermutlich auch immunmodulatorische Funktionen erfüllen (Kuhn et al., 2019).

Der aktuelle Forschungsstand legt nahe, dass die Distribution der Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC) in drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unterschiedlichen Entstehungsorten auftretenden Wellen stattfindet. Ausgehend von der subventrikulären Zone (SVZ) migriert die erste Welle an OPCs entlang des Rückenmarks in die dorsale und laterale Region des zentralen Nervensystems. Eine zweite Ursprungszone liegt in dorsalen Anteilen des Rückenmarks und Prosencephalons. Eine dritte Welle entsteht bei Geburt in dorsalen Abschnitten der SVZ, die Verteilung beschränkt sich auf den Cortex. Nach Auftritt der dritten Welle werden die OPCs der ersten Welle durch die der zweiten ersetzt (Fancy et al., 2009; Kessaris et al., 2006). Die Differenzierung zu OPCs aus neuronalen Stammzellen wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren wie Olig1/2, Nkx2.2 und Sox10 gesteuert. Im weiteren Verlauf differenzieren sich diese OPCs durch weitere spezifische Transkriptionsfaktoren zu pre-OLs, bevor diese schließlich zu reifen Oligodendrozyten heranreifen (van Tilborg et al., 2018). Durch den Einfluss von

Noxen verlieren OPCs ihre Fähigkeit der Differenzierung, sodass eine gestörte Hirnentwicklung mit insuffizienter Myelinisierung auftreten kann (French et al., 2009; Husain and Juurlink 1995).

Eingangs wurde die Rolle des CEACAM1 bezogen auf die Myelinisierung beschrieben (Prager et al., 2013). Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit ist die Untersuchung eines potentiellen Zusammenhangs zwischen Myelinisierung, dem Wnt- und TLR2/4-Signalweg und CEACAM1.

## 5.1 EXPERIMENTELLES DESIGN

Das experimentelle Design basiert grundlegend auf dem von Felderhoff-Mueser et al. 2004 angewandten Hyperoxie-Schadensmodell, welches durch das Schadensmodell der Inflammation ergänzt wurde. Durch die Wahl einer ausreichend großen Tierzahl ( $n \geq 10$  pro Gruppe) für jede Schadensgruppe sollten statistisch aussagekräftige Ergebnisse erhoben werden. Durch Randomisieren der Tiere jedes Wurfes in die verschiedenen Behandlungsgruppen sollten Pseudoreplikate vermieden werden. Aufgrund von Ausschlussfaktoren wie z.B. abweichendem Gewicht im Vergleich zur Gewichtsnorm (s. Kapitel 3.2), allgemeinem Gesundheitszustand und im Extremfall die Mortalität variieren die Tierzahlen. Durch weitere einschränkende Faktoren reduzierte sich die Anzahl der auswertbaren Tiere zusätzlich, unter anderem kann beispielhaft die komplexe Präparation der gewählten Hirnregionen genannt werden, die dazu führte, dass nicht immer das präparierte Material verwendet werden konnte. Des Weiteren kam es teilweise zu einem Verlust von Versuchstieren im Rahmen der RNA-Extraktion, die größtenteils auf die geringe Menge an Gewebematerial in Kombination mit dem verwendeten Extraktionskit zurückzuführen ist, sodass einzelne Tiere aus der Auswertung fielen.

Region Zeitpunkt	Hemisphäre				Cortex			
	p6	10				6		
p11	8	8	9	7	6	5	7	4*

Tabelle 12: Anzahl der Versuchstiere für die jeweiligen Regionen zu den Zeitpunkten p6 und p11. Die Regionen sind farbig hinterlegt, wenn es zwischen den einzelnen Therapiegruppen zu Unterschieden in der Anzahl der Tiere kam. Hierbei sind NO/NaCl grün, NO/LPS orange, HO/NaCl blau und HO/LPS grau hinterlegt. Im Cortex an p11 waren in der HO/LPS-Gruppe in den untersuchten Genen des Wnt- und TLR2/4-Signalwegs nur 4 Tiere auswertbar (mit \* gekennzeichnet).

Generell sollte auf eine ausreichende Grundanzahl von Versuchstieren geachtet und ein möglicher Verlust eingeplant werden. Zudem ist ein sorgfältiger Umgang mit dem gewonnenen Probenmaterial notwendig, um zusätzliche Verluste im Rahmen der Präparation und Materialverarbeitung zu minimieren.

## 5.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Aufgrund einer nicht durchgehend vorhandenen Tierzahl von  $n=10$  wurde eine differenzierte statistische Methodik gewählt, um dieser statistischen Verzerrung entgegenzuwirken.

Im Idealfall liegen ermittelte Werte Gauß-verteilt vor, die varianzhomogen ist. Diese Voraussetzungen sind durch den Levene-Test und vergleichbare Tests zu prüfen und zu bestätigen. Mit der damit einhergehenden Bestätigung der grundlegenden Voraussetzungen wären die Kriterien für eine Hypothesenprüfung durch ANOVA und eine post-hoc Testung durch Tukey's-HSD gegeben. Bei dieser Arbeit kommt es in einigen Therapiegruppen zu Varianzinhomogenitäten, welche eine gesonderte statistische Betrachtung (Welch's-ANOVA) erfordern. Grundsätzlich sollten daher die statistischen Signifikanzen in den Hypothesentestungen entsprechend berücksichtigt werden.

## 5.3 HISTOLOGIE

Die immunhistochemische Untersuchung wurde vorgenommen, um der Fragestellung nachzugehen, ob es zu Expressionsunterschieden in den einzelnen Schadensgruppen kommt. Zusätzlich wurde versucht eine Färbung für den Wnt- und TLR2/4-Signalweg zu etablieren, um eine Kolokalisation mit CEACAM1 zu untersuchen. Diese Kolokalisation wäre eine Voraussetzung, um eine Interaktion der Signalwege annehmen zu können.

Die Färbung für den Wnt- und TLR2/4-Signalweg ließ sich nicht etablieren. Es wurde beta-Catenin Antikörper sc-7963 von Santa Cruz Biotechnology für den Wnt-Signalweg herangezogen, welcher für die hochkonservierte, C-terminale Aminosäuresequenz (Sequenzabschnitt: 680-781) ausgelegt ist, die bei Menschen, Mäusen und Ratten fast absolut identisch ist. In einer Arbeit von Jin et al. konnte eine Färbung mit  $\beta$ -Catenin und CEACAM1 in Kolokalisation in der Zellkultur etabliert werden, allerdings wurden hierfür

Brustepithelzellen und Jurkat-Zellen der Maus verwendet (Jin et al., 2008). Für den TLR2-Signalweg wurde zur Etablierung der IHC der monoklonale TLR2-Antikörper mT2.4 von Thermo Scientific verwendet. Der TLR4-Antikörper von Abbiotec wurde zur Etablierung der Färbung des TLR4-Signalweges genutzt. Die Hintergründe, die dazu führten, dass sich die Kofärbungen nicht etablieren ließen, wurden nicht weiterverfolgt.

Mögliche weitere Antikörper, die zur Kolo-kalisation von CEACAM1 und dem Wnt-Signalweg herangezogen werden könnten, sind LRP5/6-Antikörper.

Die Schnittebenen wurden basierend auf zuvor veröffentlichten Arbeiten ausgewählt. In den vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass sich in den untersuchten Ebenen zum Zeitpunkt p11 deutliche Myelinisierung und CEACAM1-Expression feststellen lässt. Sowohl MBP als auch CEACAM1 lassen sich bereits an p5 im Mittelhirn und ab p7 im Bereich der Capsula interna und externa und im Verlauf schließlich in den Basalganglien nachweisen (Prager et al., 2013).

Eine modulierte CEACAM1-Expression der Oligodendrozyten, induziert durch die Schädigungsmodelle, ist immunhistochemisch nicht nachweisbar. An p11 konnten dementsprechend keine eindeutigen Veränderungen zwischen den Schadensgruppen nachgewiesen werden, daher ist auf immunhistochemischer Ebene keine Aussage über den Zusammenhang der genannten Signalwege zu treffen.

Die Immunhistochemie stellt eine hinreichende Methode dar, um ausgeprägte Veränderungen zu detektieren, jedoch ist sie keine sensible Methode, um geringe Veränderungen festzustellen. Ein Grund, weswegen kein Schaden nachgewiesen werden konnte, wäre, dass die „Auflösungsgrenze“ durch den induzierten Schaden nicht erreicht wurde. Um geringfügigere Veränderungen festzustellen, sind molekulargenetische Untersuchungen unumgänglich (*siehe Kapitel 5.5*).

## 5.4 ZELLKULTUREN

Die zellbiologischen Ergebnisse der primären Oligodendrozyten-Kulturen unterstützen die Annahme, dass CEACAM1 eine Rolle in der Myelinisierung einnimmt. Nach 24 Stunden konnte CEACAM1 auf Oligodendrozyten in der Zellkultur nachgewiesen werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Zellkulturen lässt sich die Differenzierung der Oligodendrozyten durch die spezifischen Marker (O4, O1 und MBP) nachweisen. Alle O4-

und O1-positiven Zellen sind auch CEACAM1 positiv. Zudem gibt es auch Zellen, die vor O4- und O1-Expression bereits CEACAM1 positiv sind (*Abbildung 12A und 12B*).

Nicht alle CEACAM1 positiven Oligodendrozyten waren auch mit einem positiven MBP-Nachweis verbunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Zellen, die O1/O4/MBP positiv sind auch CEACAM1 positiv sind. Allerdings gibt es auch Zellen, die CEACAM1 positiv und O1/O4/MBP negativ sind. Zellen, die O4/O1/MBP positiv, aber CEACAM1 negativ waren, wurden nicht nachgewiesen, die CEACAM1-Expression geht der Expression der Oligodendrozytenmarker also voraus. Daher lässt sich vermuten, dass CEACAM1 vor O4/O1/MBP positiv wird und eine modulierende Wirkung auf die Initiierung oder den Ablauf der Myelinisierung haben kann.

Mittlerweile konnte in primären Neuronenkulturen gezeigt werden, dass CEACAM1 auch auf Neuronen exprimiert wird (persönliche Kommunikation mit Dr. med. Prager). Mit diesem Wissen ist eine mögliche Funktion des CEACAM1 bei der Zell-Zell-Interaktion zwischen Oligodendrozyten und Neuronen denkbar.

Neben der Immunhistochemie wurde auch in der Immunzytochemie versucht eine Kofärbung mit TLR2/4 sowie  $\beta$ -Catenin zum Nachweis räumlicher Nähe zu CEACAM1 zu etablieren. Die Etablierung war nicht erfolgreich.

## **5.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE ERGEBNISSE**

### **5.5.1 CEACAM1**

In dieser Arbeit wurde eine veränderte CEACAM1-Expression unter Schadenseinfluss im Rattenhirn nachgewiesen.

In der Hemisphäre wurde aufgezeigt, dass einzelne CEACAM1-Isoformen im Rahmen des Schädigungsmodells moduliert werden. Im weiterführenden Schritt wurde die Analyse um den Cortex jeweils an p6 und p11 erweitert. Einzig an p6 liegt im Cortex eine signifikante Veränderung für CEACAM1-L in den LPS-Schadensgruppen vor. Hyperoxie allein führt zu keiner Veränderung.

Bisher konnte immunhistochemisch eine relative deckungsgleiche Koexpression von CEACAM1 und MBP an p11 gezeigt werden. In der ICC ist CEACAM1 bereits vor MBP

nachweisbar. Werden diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Herunterregulierung des CEACAM1 an p6 im Cortex betrachtet, lässt sich spekulieren, ob die verminderte Myelinisierung durch LPS-Schaden CEACAM1-vermittelt sein könnte.

Die Diskrepanz der Ergebnisse für die CEACAM1-Expression im Cortex im Vergleich zur Hemisphäre lässt sich zusätzlich durch diese mögliche Ursache erklären: präparationsbedingt werden Einbußen stark myelinisierender Bereiche und somit stark CEACAM1-exprimierender Bereiche entstanden sein. Bei der Präparation des Cortex wird ein Bereich entfernt, der früh myelinisierende Anteile wie Balken und Capsula externa enthält. Da CEACAM1-Expression und Myelinisierung eine deutliche spatiotemporale Übereinstimmung aufweisen, gehen demzufolge auch für CEACAM1-exprimierende Anteile verloren, die für die Analyse relevant gewesen wären.

### 5.5.2 WNT-SIGNALWEG

Sowohl Axin2 als auch beta-Catenin wurden in der Hemisphäre an p11 sowie im Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11 nachgewiesen. Axin2 zeigt im Cortex an p6 ähnliche Tendenzen wie beta-Catenin, allerdings ohne Signifikanzen zu erreichen.

Bei beta-Catenin liegt im Cortex an p6 eine signifikant erhöhte Expression in der LPS/NO-Gruppe vor. In der LPS/HO-Gruppe liegt ebenfalls eine Erhöhung vor, die Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe wird knapp nicht erreicht. Weitere relevante Signifikanzen lagen nicht vor. Zeitgleich an p6 ist im Cortex CEACAM1-L in den gleichen Schadensgruppen signifikant herunterreguliert. Das sich ähnelnde, aber inverse Expressionsmuster an p6 im Cortex könnte ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Wnt- und CEACAM1-Signalweg sein. Es könnte auf eine reziproke Einflussnahme hindeuten. Die erhöhte Expression des beta-Catenin bei gleichzeitiger Erniedrigung der CEACAM1-L-Expression könnte ein Hinweis für eine CEACAM1-beeinflusste gestörte Myelinisierung sein, da ein aktivierter beta-Catenin/Wnt-Signalweg die Differenzierung von OPCs nach Schadenseinfluss hemmt (Fancy et al., 2009; Fancy et al., 2011; Guo et al., 2015).

Allerdings beziehen sich die Ergebnisse dieser Analyse auf komplette Hirnregionen, also auf ein „Gemisch“ der verschiedenen Zelltypen. Demzufolge können Veränderungen der Genexpression in einem Zelltyp, beispielsweise Oligodendrozyten, durch andere Zelltypen ohne Veränderung verwässert oder bei gegenläufiger Veränderung sogar aufgehoben oder

ins Gegenteil umgekehrt werden. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Verwendung von primären Oligodendrozytenkulturen. Dieser Ansatz ist jedoch mit dem Nachteil behaftet, dass ein artifizielles System verwendet wird, das die Komplexität des Gehirns nur unzureichend widerspiegelt. Aufgrund der teilweise geringen Grundmenge in den jeweiligen Therapiegruppen, wäre zur Verifizierung der Signifikanzen eine Wiederholung der Versuchsreihe mit einer größeren Fallzahl sinnvoll.

Um dem Hinweis eines möglichen Zusammenhanges zwischen dem Wnt- und CEACAM1-Signalweg nachzugehen, sollten weitere Versuchsansätze erfolgen. Die IHC zur Überprüfung einer möglichen Koexpression zwischen CEACAM1 und beta-Catenin ließ sich in dieser Arbeit nicht etablieren, wäre jedoch eine geeignete Methode, um einen eventuellen spatiotemporalen Zusammenhang aufzudecken. Ein funktioneller Zusammenhang könnte in primären Oligodendrozytenkulturen untersucht werden. Hierbei könnten mit CEACAM1-Agonisten/-Antagonisten beschichtete Zellkulturplatten verwendet werden, um den Einfluss einer Stimulation oder Hemmung von CEACAM1 auf die Myelinisierung sowie die Aktivität des Wnt-Signalwegs zu untersuchen. Sollte es in diesem Versuchsaufbau unter CEACAM1-Stimulation oder -Inhibition zu einer Veränderung der Myelinisierung und einer Modulation des Wnt-Signalwegs kommen, wäre dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass CEACAM1 über den Wnt-Signalweg die Myelinisierung beeinflusst. In einem Folgeexperiment könnte untersucht werden, ob dieser Effekt durch Modulation des Wnt-Signalwegs aufgehoben werden könnte. Es hat sich schon gezeigt, dass in Neuronen die Aktivierung des Wnt-Signalwegs über GDE2 zur Ausschüttung von Phosphacan führt. Dies signalisiert eine Oligodendrozyten-Differenzierung, wodurch die Oligodendrozyten letztendlich zur Myelinisierung angeregt werden (Choi et al., 2020). Ein weiterer Ansatz für eine mögliche Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und CEACAM1 innerhalb von Oligodendrozyten könnte mithilfe einer Phosphacan-Stimulation von OPCs untersucht werden. Mit zuvor beschriebenen und allgemein bekannten genetischen Methoden ließe sich dieser Ansatz untersuchen.

### 5.5.3 TLR2/4-SIGNALWEG

Bei den Genen, die für diese Arbeit beim TLR2/4-Signalweg untersucht worden sind (MyD88, Traf6, Ticam2), liegen für alle signifikante Expressionsmuster in der Hemisphäre an p11 im Vergleich zwischen der NO/LPS- und HO/LPS-Schadensgruppe vor, ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe liegt jeweils nicht vor.

Zusätzlich wies MyD88 im Cortex an p6 eine Signifikanz zwischen NO/LPS- zur Kontrollgruppe auf. Diese statistischen Signifikanzen lassen kein einheitliches Muster erkennen und beruhen am ehesten auf Fehlern der 1. Art. Aus den vorliegenden Ergebnissen zum TLR2/4-Signalweg kann kein Rückschluss über einen Zusammenhang zwischen CEACAM1 und dem TLR2/4-Signalweg gezogen werden.

Ferner enthielt das untersuchte Gewebe neben Oligodendrozyten weitere Zelltypen, sodass mögliche Effekte auf die untersuchten Signalwege hierdurch verschleiert geblieben sein könnten. Daher wäre eine Untersuchungsreihe mit primären Oligodendrozytenkulturen, die unter Schadenseinfluss stehen, möglicherweise sinnvoll. In anderen Gewebetypen hat sich eine direkte Einflussnahme auf die CEACAM1-Ausprägung auf der Membranoberfläche durch die positive Modulation von TLR2 und TLR4 gezeigt (Schirbel et al., 2019).

## **5.6 BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE**

Ziel dieser Arbeit war, einen kausalen Zusammenhang zwischen CEACAM1 und der Myelinisierung herzustellen. Als vielversprechende Signalwege für diesen Zusammenhang wurden der Wnt-Signalweg und der TLR2/4-Signalweg identifiziert. Ein Zusammenhang zwischen CEACAM1, TLR2-/TLR4-Signalweg und Myelinisierung konnte im Rahmen der Versuchsreihe nicht aufgedeckt werden. Allerdings könnte weiterhin ein möglicher Zusammenhang zwischen CEACAM1, TLR2-/TLR4-Signalweg und der Myelinisierung vermutet werden, da in anderem Gewebe schon ein Zusammenhang zwischen TLR2- bzw. TLR4-Stimulation, gesteigerter CEACAM1-Expression und erhöhter Proliferation nachgewiesen wurde (Schirbel et al., 2019). Der nächste Schritt wäre, ein Modell zu etablieren, in dem durch Stimulation/Hemmung von CEACAM1 die Myelinisierung modifiziert werden kann (beispielsweise in einer primären Oligodendrozytenkultur). In diesem Modell könnte die Interaktion zwischen CEACAM1 und dem TLR2-/TLR4-Signalweg untersucht werden.

Hinsichtlich eines Zusammenhangs des Wnt-Signalwegs mit CEACAM1 und der Myelinisierung ergaben sich in dieser Arbeit schwache Hinweise, die diese Hypothese stützen. Möglicherweise ist dies durch den Versuchsaufbau bedingt, so dass eine erneute Untersuchung erfolgen sollte. Die Etablierung eines Modells, in dem durch Stimulation/Hemmung von CEACAM1 die Myelinisierung modifiziert werden kann

(beispielsweise in einer primären Oligodendrozytenkultur), ist hier ebenfalls der nächste Schritt. Sollte sich in diesem Modell die Interaktion CEACAM1 - Wnt-Signalweg - Myelinisierung bestätigen, ist dem Verständnis der komplexen Steuerung der Myelinisierung ein weiteres Puzzleteil hinzugefügt, um eventuelle Ansatzpunkte für zukünftige therapeutische Ansätze zu erhalten. Diese könnten möglicherweise genutzt werden, um die durch Frühgeburtlichkeit hervorgerufenen Hirnschädigungen wie eine Hypomyelinisierung protektiv oder kurativ zu therapieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) ist im sich entwickelnden Gehirn der Ratte ab dem 7. postnatalen Tag auf myelinisierenden Strukturen nachweisbar und unter Schadenseinfluss von Hyperoxie/Inflammation in seiner Expression negativ korrelierend zur Myelinisierung verändert. Unklar ist, ob und wenn ja über welche Signalwege CEACAM1 mit der Myelinisierung interagiert, zumal die Regulationsmechanismen der Myelinisierung komplex sind. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass CEACAM1 entweder über den Wnt-Signalweg oder den Toll-like Rezeptor 2/4 (TLR2/TLR4)-Signalweg Einfluss auf die Myelinisierung nimmt.

Anknüpfend an die nachgewiesene Schädigung von Myelin und Veränderung der CEACAM1-Expression an Tag 11 (p11) in Realtime Polymerasekettenreaktion (qPCR) in einem hyperoxie- und inflammationsinduzierten Schädigungsmodell im sich entwickelnden Rattenhirn wurde zunächst in dieser Arbeit immunhistochemisch versucht, den Nachweis dieser CEACAM1-Veränderung festzustellen, was sich nicht etablieren ließ. Im zweiten Schritt wurden zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges des Wnt- und TLR2/4- Signalweges immunhistochemische und immunzytochemische Färbungen durchgeführt, um eine Kollokalisierung zum CEACAM1 nachzuweisen. Molekulargenetisch erfolgten die Untersuchungen von kompletten Hemisphären und Cortices an p6 und p11 jeweils in einer Kontrollgruppe als auch nach einer Schädigung mit Lipopolysaccharid (LPS), Hyperoxie oder der Kombination beider Noxen. Hierbei wurden Genexpressionsanalysen für ausgewählte Gene des Wnt-, TLR2- und TLR4-Signalwegs sowie für CEACAM1 inklusive der CEACAM1-Isoformen durchgeführt, um eine mögliche Korrelation zwischen CEACAM1 und dem Wnt- bzw. TLR2-/TLR4-Signalweg zu erfassen. Anhand dieser Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen CEACAM1 und dem TLR2- bzw. TLR4-Signalweg nachgewiesen werden. Es besteht aber ein Zusammenhang zwischen CEACAM1 und dem Wnt-Signalweg. Im Cortex an p6 ließen sich gegenläufige Veränderungen in der Genexpression im Wnt-Signalweg und von CEACAM1 aufzeigen. Hieran anknüpfend sollten weiterführende Untersuchungen unternommen werden. Möglich wären Untersuchungen an primären Oligodendrozytenkulturen mit einer CEACAM1-stimulierten und -inhibierten Gruppe zusätzlich zur Kontrollgruppe. Sollte sich eine Veränderung der Myelinisierung und eine Modulation im Wnt-Signalweg zeigen, wäre dies ein Hinweis dafür, dass CEACAM1 über den Wnt-Signalweg die Myelinisierung beeinflusst.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1.] Arpino, C., Compagnone, E., Montanaro, M.L., Cacciatore, D., Luca, A. de, Cerulli, A., Di Girolamo, S., Curatolo, P. (2010): Preterm birth and neurodevelopmental outcome: a review. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 26.
- [2.] Back, S.A., Miller, S.P. (2014): Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? *Annals of neurology*. 75.
- [3.] Billiards, S.S., Haynes, R.L., Folkerth, R.D., Borenstein, N.S., Trachtenberg, F.L., Rowitch, D.H., Ligon, K.L., Volpe, J.J., Kinney, H.C. (2008): Myelin abnormalities without oligodendrocyte loss in periventricular leukomalacia. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 18.
- [4.] Blencowe, H., Cousens, S., Chou, D., Oestergaard, M., Say, L., Moller, A.-B., Kinney, M., Lawn, J. (2013): Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive health*. 10 Suppl 1.
- [5.] Brehmer, F., Bendix, I., Prager, S., van de Looij, Y., Reinboth, B.S., Zimmermanns, J., Schlager, G.W., Brait, D., Sifringer, M., Endesfelder, S., Sizonenko, S., Mallard, C., Bühner, C., Felderhoff-Mueser, U., Gerstner, B. (2012): Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PloS one*. 7.
- [6.] Bsibsi, M., Nomden, A., van Noort, J.M., Baron, W. (2012): Toll-like receptors 2 and 3 agonists differentially affect oligodendrocyte survival, differentiation, and myelin membrane formation. *Journal of neuroscience research*. 90.
- [7.] Budt, M., Michely, B., Müller, M.M., Reutter, W., Lucka, L. (2002): Secreted CEACAM1 splice variants in rat cell lines and in vivo in rat serum. *Biochemical and biophysical research communications*. 292.
- [8.] Chang, H.H., Larson, J., Blencowe, H., Spong, C.Y., Howson, C.P., Cairns-Smith, S., Lackritz, E.M., Lee, S.K., Mason, E., Serazin, A.C., Walani, S., Simpson, J.L., Lawn, J.E. (2013): Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *The Lancet*. 381.

- [9.] Chen, Z., Chen, L., Qiao, S.-W., Nagaishi, T., Blumberg, R.S. (2008): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits proximal TCR signaling by targeting ZAP-70. *The Journal of Immunology*. 180.
- [10.] Choi, B.-R., Cave, C., Na, C.H., Sockanathan, S. (2020): GDE2-Dependent Activation of Canonical Wnt Signaling in Neurons Regulates Oligodendrocyte Maturation. *Cell reports*. 31.
- [11.] Choi, J.Y., Kim, B.G. (2017): Toll-like Receptor 2: A Novel Therapeutic Target for Ischemic White Matter Injury and Oligodendrocyte Death. *Experimental neurobiology*. 26.
- [12.] Choi, Y.Y. (2014): Necrotizing enterocolitis in newborns: update in pathophysiology and newly emerging therapeutic strategies. *Korean journal of pediatrics*. 57.
- [13.] Church, J.S., Milich, L.M., Lerch, J.K., Popovich, P.G., McTigue, D.M. (2017): E6020, a synthetic TLR4 agonist, accelerates myelin debris clearance, Schwann cell infiltration, and remyelination in the rat spinal cord. *Glia*. 65.
- [14.] Clevers, H., Nusse, R. (2012): Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*. 149.
- [15.] Dai, Z.-M., Sun, S., Wang, C., Huang, H., Hu, X., Zhang, Z., Lu, Q.R., Qiu, M. (2014): Stage-specific regulation of oligodendrocyte development by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 34.
- [16.] Doyle, L.W., Roberts, G., Anderson, P.J. (2010): Outcomes at age 2 years of infants < 28 weeks' gestational age born in Victoria in 2005. *The Journal of pediatrics*. 156.
- [17.] Edlund, M., Gaardsvoll, H., Bock, E., Obrink, B. (1993): Different isoforms and stock-specific variants of the cell adhesion molecule C-CAM (cell-CAM 105) in rat liver. *Eur J Biochem*. 213.
- [18.] Edlund, M., Wikström, K., Toomik, R., Ek, P., Öbrink, B. (1998): Characterization of protein kinase C-mediated phosphorylation of the short cytoplasmic domain isoform of C-CAM. *FEBS Letters*. 425.
- [19.] Ergün, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Götze, J., Wurmbach, J.H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C. (2000): CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Molecular cell*. 5.

- [20.] Euro-Peristat Project (2018): European Perinatal Health Report.
- [21.] Fancy, S.P.J., Baranzini, S.E., Zhao, C., Yuk, D.-I., Irvine, K.-A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R.J.M., Rowitch, D.H. (2009): Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes & development*. 23.
- [22.] Fancy, S.P.J., Harrington, E.P., Yuen, T.J., Silbereis, J.C., Zhao, C., Baranzini, S.E., Bruce, C.C., Otero, J.J., Huang, E.J., Nusse, R., Franklin, R.J.M., Rowitch, D.H. (2011): Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nature neuroscience*. 14.
- [23.] Feigenson, K., Reid, M., See, J., Crenshaw, E.B., Grinspan, J.B. (2009): Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Molecular and cellular neurosciences*. 42.
- [24.] Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Siffringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L., Piening, T., Moysich, A., Grune, T., Thor, F., Heumann, R., Bührer, C., Ikonomidou, C. (2004): Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiology of disease*. 17.
- [25.] Felderhoff-Mueser, U., Siffringer, M., Polley, O., Dzierko, M., Leineweber, B., Mahler, L., Baier, M., Bittigau, P., Obladen, M., Ikonomidou, C., Bührer, C. (2005): Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Annals of neurology*. 57.
- [26.] French, H.M., Reid, M., Mamontov, P., Simmons, R.A., Grinspan, J.B. (2009): Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *Journal of neuroscience research*. 87.
- [27.] Gerstner, B., DeSilva, T.M., Genz, K., Armstrong, A., Brehmer, F., Neve, R.L., Felderhoff-Mueser, U., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A. (2008): Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28.
- [28.] Gold, P., Freedman, S.O. (1965): Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *The Journal of experimental medicine*. 122.
- [29.] Grasselli, C., Ferrari, D., Zalfa, C., Soncini, M., Mazzoccoli, G., Facchini, F.A., Marongiu, L., Granucci, F., Copetti, M., Vescovi, A.L., Peri, F., Filippis, L. de (2018): Toll-like receptor 4 modulation influences human neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell death & disease*. 9.

- [30.] Gray-Owen, S.D., Blumberg, R.S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nature reviews. Immunology*. 6.
- [31.] Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., Singer, B.B. (2003): CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 74.
- [32.] Guo, F., Lang, J., Sohn, J., Hammond, E., Chang, M., Pleasure, D. (2015): Canonical Wnt signaling in the oligodendroglial lineage--puzzles remain. *Glia*. 63.
- [33.] Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., Gressens, P. (2015): The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature reviews. Neurology*. 11.
- [34.] Houde, C., Roy, S., Leung, N., Nicholson, D.W., Beauchemin, N. (2003): The cell adhesion molecule CEACAM1-L is a substrate of caspase-3-mediated cleavage in apoptotic mouse intestinal cells. *The Journal of biological chemistry*. 278.
- [35.] Howson, C.P., Kinney, M.V., McDougall, L., Lawn, J.E. (2013): Born too soon: preterm birth matters. *Reproductive health*. 10 Suppl 1.
- [36.] Husain, J., Juurlink, B.H. (1995): Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain research. Developmental brain research*. 1995.
- [37.] Iijima, H., Neurath, M.F., Nagaishi, T., Glickman, J.N., Nieuwenhuis, E.E., Nakajima, A., Chen, D., Fuss, I.J., Utku, N., Lewicki, D.N., Becker, C., Gallagher, T.M., Holmes, K.V., Blumberg, R.S. (2004): Specific regulation of T helper cell 1-mediated murine colitis by CEACAM1. *The Journal of experimental medicine*. 199.
- [38.] Inder, T.E., Warfield, S.K., Wang, H., Hüppi, P.S., Volpe, J.J. (2005): Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants. *Pediatrics*. 115.
- [39.] Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., Costantini, F. (2002): Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 22.
- [40.] Jin, L., Li, Y., Chen, C.-J., Sherman, M.A., Le, K., Shively, J.E. (2008): Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 233.

- [41.] Kawasaki, T., Kawai, T. (2014): Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 5.
- [42.] Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., Richardson, W.D. (2006): Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature neuroscience*. 9.
- [43.] Khwaja, O., Volpe, J.J. (2008): Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*. 93.
- [44.] Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Neshat-Vahid, S., Irmak, S., Obst-Pernberg, K., Wurmbach, J.-H., Loges, S., Kilic, E., Weil, J., Lauke, H., Tilki, D., Singer, B.B., Ergün, S. (2007): Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1. *Blood*. 110.
- [45.] Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Wurmbach, J.-H., Loges, S., Chalajour, F., Neshat-Vahid, S., Vahid, S.N., Weil, J., Fernando, M., Ergun, S. (2005): Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *The Journal of biological chemistry*. 280.
- [46.] Kim, W.M., Huang, Y.-H., Gandhi, A., Blumberg, R.S. (2019): CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Seminars in immunology*. 42.
- [47.] Kirshner, J., Chen, C.-J., Liu, P., Huang, J., Shively, J.E. (2003): CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100.
- [48.] Kleinerman, D.I., Troncoso, P., Lin, S.H., Pisters, L.L., Sherwood, E.R., Brooks, T., Eschenbach, A.C. von, Hsieh, J.T. (1995): 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 research*. 55.
- [49.] Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., Dombrowski, Y. (2019): Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 8.
- [50.] Kunath, T., Ordoñez-García, C., Turbide, C., Beauchemin, N. (1995): Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*. 11.

- [51.] Kwak, D.J., Kwak, S.D., Gauda, E.B. (2006): The effect of hyperoxia on reactive oxygen species (ROS) in rat petrosal ganglion neurons during development using organotypic slices. *Pediatric research*. 60.
- [52.] Lee, J., Dammann, O. (2012): Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 17.
- [53.] Lehnardt, S., Henneke, P., Lien, E., Kasper, D.L., Volpe, J.J., Bechmann, I., Nitsch, R., Weber, J.R., Golenbock, D.T., Vartanian, T. (2006): A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *The Journal of Immunology*. 177.
- [54.] Leung, N., Turbide, C., Balachandra, B., Marcus, V., Beauchemin, N. (2008): Intestinal tumor progression is promoted by decreased apoptosis and dysregulated Wnt signaling in Ceacam1<sup>-/-</sup> mice. *Oncogene*. 27.
- [55.] Lix, L.M., Keselman, J.C., Keselman, H.J. (1996): Consequences of Assumption Violations Revisited: A Quantitative Review of Alternatives to the One-Way Analysis of Variance F Test. *Review of Educational Research*. 66.
- [56.] Logan, C.Y., Nusse, R. (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 20.
- [57.] Lu, R., Pan, H., Shively, J.E. (2012): CEACAM1 negatively regulates IL-1 $\beta$  production in LPS activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYK-TLR4-CEACAM1 complex. *PLoS pathogens*. 8.
- [58.] Martin, J.A., Hamilton, B.E., Osterman, M.J.K., Driscoll, A.K. (2021): Births: Final Data for 2019. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*. 70.
- [59.] Najjar, S.M., Accili, D., Philippe, N., Jernberg, J., Margolis, R., Taylor, S.I. (1993): pp120/ecto-ATPase, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase, is expressed as two variably spliced isoforms. *J. Biol. Chem*. 268.
- [60.] Nusse, R., Clevers, H. (2017): Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 169.
- [61.] Öbrink, B. (1997): CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Current opinion in cell biology*. 9.

- [62.] Odin, P., Tingström, A., Obrink, B. (1986): Chemical characterization of cell-CAM 105, a cell-adhesion molecule isolated from rat liver membranes. *Biochem. J.* 236.
- [63.] Oikawa, S., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Kosaki, G., Nakazato, H. (1992): Homotypic and heterotypic Ca<sup>++</sup>-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochemical and biophysical research communications.* 186.
- [64.] Prager, S., Singer, B.B., Bendix, I., Schlager, G.W., Bertling, F., Ceylan, B., Keller, M., Felderhoff-Mueser, U., Ergün, S. (2013): CEACAM1 expression in oligodendrocytes of the developing rat brain shows a spatiotemporal relation to myelination and is altered in a model of encephalopathy of prematurity. *Developmental neuroscience.* 35.
- [65.] Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., Schwartz, M. (2007): Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature cell biology.* 9.
- [66.] Rosenberg, M., Nédellec, P., Jothy, S., Fleiszer, D., Turbide, C., Beauchemin, N. (1993): The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer research.* 53.
- [67.] Sawa, H., Kamada, K., Sato, H., Sendo, S., Kondo, A., Saito, I., Edlund, M., Obrink, B. (1994): C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Brain research. Developmental brain research.* 78.
- [68.] Schirbel, A., Rebert, N., Sadler, T., West, G., Rieder, F., Wagener, C., Horst, A., Sturm, A., La Motte, C. de, Fiocchi, C. (2019): Mutual Regulation of TLR/NLR and CEACAM1 in the Intestinal Microvasculature: Implications for IBD Pathogenesis and Therapy. *Inflammatory bowel diseases.* 25.
- [69.] Schmitz, T., Ritter, J., Mueller, S., Felderhoff-Mueser, U., Chew, L.-J., Gallo, V. (2011): Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 31.
- [70.] Shimizu, T., Kagawa, T., Wada, T., Muroyama, Y., Takada, S., Ikenaka, K. (2005): Wnt signaling controls the timing of oligodendrocyte development in the spinal cord. *Developmental biology.* 282.
- [71.] Sienel, W., Dango, S., Woelfle, U., Morresi-Hauf, A., Wagener, C., Brümmer, J., Mutschler, W., Passlick, B., Pantel, K. (2003): Elevated expression of

carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 9.

- [72.] Singer, B., Lucka, L. (2005): CEACAM1. *AfCS-Nature Molecule Pages*.
- [73.] Singer, B.B. (2011): Molekulare Mechanismen und funktionelle Bedeutung von CEACAM1 (Carcino Embryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1) als Ko-Rezeptor in immunologischen Prozessen.
- [74.] Singer, B.B., Opp, L., Heinrich, A., Schreiber, F., Binding-Liermann, R., Berrocal-Almanza, L.C., Heyl, K.A., Müller, M.M., Weimann, A., Zweigner, J., Slevogt, H. (2014): Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PloS one.* 9.
- [75.] Singer, B.B., Scheffrahn, I., Heymann, R., Sigmundsson, K., Kammerer, R., Obrink, B. (2002): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *The Journal of Immunology.* 168.
- [76.] Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'guessan, P.D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N., Singer, B.B. (2008): CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nature immunology.* 9.
- [77.] Takeda, K., Akira, S. (2015): Toll-like receptors. *Current protocols in immunology.* 109.
- [78.] Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003): Toll-like receptors. *Annual review of immunology.* 21.
- [79.] Thies, A., Moll, I., Berger, J., Wagener, C., Brümmer, J., Schulze, H.-J., Brunner, G., Schumacher, U. (2002): CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 20.
- [80.] Thompson, J.A., Grunert, F., Zimmermann, W. (1991): Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5.
- [81.] Tucker, J., McGuire, W. (2004): Epidemiology of preterm birth. *BMJ (Clinical research ed.).* 329.

- [82.] van Tilborg, E., Theije, C.G.M. de, van Hal, M., Wagenaar, N., Vries, L.S. de, Benders, M.J., Rowitch, D.H., Nijboer, C.H. (2018): Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*. 66.
- [83.] Volpe, J.J. (2001): Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatric research*. 50.
- [84.] Volpe, J.J. (2009a): Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology*. 8.
- [85.] Volpe, J.J. (2009b): The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Seminars in pediatric neurology*. 16.
- [86.] Volpe, J.J. (2012): Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Annals of neurology*. 72.
- [87.] Volpe, J.J., Kinney, H.C., Jensen, F.E., Rosenberg, P.A. (2011): The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 29.
- [88.] Zeitlin, J., Szamotulska, K., Drewniak, N., Mohangoo, A.D., Chalmers, J., Sakkeus, L., Irgens, L., Gatt, M., Gissler, M., Blondel, B. (2013): Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 120.

### Onlineliteraturverzeichnis

- [1.] Deutsches Frühgeborenen Netzwerk (GNN): Studie zur langfristigen Entwicklung von sehr kleinen Frühgeborenen, Bericht 2016  
Online-Publikation; <https://www.vlbw.de/Bisherige+Ergebnisse.html>
- [2.] IQTIG: Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2020 Neonatologie  
Qualitätsindikatoren, Bericht 2020  
Online-Publikation; [https://iqtig.org/downloads/auswertung/2020/16n1gebh/QSKH\\_16n1-GEBH\\_2020\\_BUAW\\_V01\\_2021-08-10.pdf](https://iqtig.org/downloads/auswertung/2020/16n1gebh/QSKH_16n1-GEBH_2020_BUAW_V01_2021-08-10.pdf)
- [3.] AWMF online: Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, der

Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung und der Deutschen  
Gesellschaft für Kinderchirurgie Nekrotisierende Enterokolitis (NEK), 2017,  
AWMF-Leitlinien-Register Nr. 024/009

Online-Publikation; [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/024-009l\\_S2k\\_Nekrotisierende\\_Enterokolitis\\_2018-02.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-009l_S2k_Nekrotisierende_Enterokolitis_2018-02.pdf)

[4.] Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann: The carcinoembryonic antigen  
homepage, 2018

Online-Publikation; <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/rat/index.html>

## 8 ANHANG

---

### 8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Axin2	axis inhibiting protein 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
bzw.	beziehungsweise
CEA	Carcinoembryonic antigen
cDNA	komplementäre DNA
CNTF	Ciliary neurotropic factor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	Caudatoputamen
CWFS	Cold-Water-Fish-Skin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dv1	Dishevelled
Fe <sup>2+</sup>	Eisenionen
ELBW	extreme low birth weight
GDE2	Glycerophosphodiester Phosphodiesterase 2
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
ICH	Intrakranielle Hämorrhagie
Ig	Immunglobulin

IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO	Kaliumdihydrogenphosphat
L	long
LBW	low birth weight
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
LRR	Leucine-rich Repeat
MAPK	mitogen-activated protein-Kinase
MBP	myelin basic protein
MD-2	myeloid differentiation factor 2
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Ncl.	Nucleus
NEK	Nekrotisierende Enterokolitis
NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Normal goat serum
NSCLC	Non-small cell lung cancer
O1	Oligodendrozytenmarker 1
O4	Oligodendrozytenmarker 4

OPC	Oligodendrocyte precursor cells (Oligodendrozyten-Vorläuferzellen)
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PDGF $\alpha$	platelet derived growth factor $\alpha$
Pre-OL	immature premyelinating oligodendrocytes (unreife nicht-myelinisierende Oligodendrozyten)
PVL	periventriculäre Leukomalazie
qPCR	Quantitative real-time PCR
RDS	Respiratory distress syndrome
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Retinopathia praematurorum
RT	Raumtemperatur
S	small
SSW	Schwangerschaftswoche
SVZ	subventricular zone (Subventrikuläre Zone)
TCF	T-cell factor
Ticam2	TIR domain-containing adapter molecule 2
TIR	Toll-Interleukin-1-Rezeptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
Traf6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TLR	Toll-like Rezeptor
VLBW	very low birth weight
ZNS	zentrales Nervensystem

## Einheiten

g	Gramm
h	Stunde
kg	Kilogramm
M	mol/l
mm	Millimeter
mM	Millimol/l
nM	Nanomol/l
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
nm	Nanometer
U	Unit

## 8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zystische und nicht-zystische PVL (aus J.J. Volpe, 2009a).....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung von CEACAM1 in der Ratte.....	15
Abbildung 3: CEACAM1-positive Strukturen im Prosencephalon .....	18
Abbildung 4: Darstellung des Wnt-Signalweges.....	21
Abbildung 5: Darstellung des TLR2/4-Signalweges .....	24
Abbildung 6: Schnittebenen A & B (Koronarschnitte des Rattengehirns), die für die immunhistochemische Analyse gewählt wurden .....	33
Abbildung 7: Präparation der Hirnregionen.....	38
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Effizienztestung für Axin2.....	44
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von CEACAM1 an p11 .....	52
Abbildung 10: Immunhistochemische Kofärbung von CEACAM1 (rot) und MBP (grün) an p11 - Hippocampus.....	53

Abbildung 11: Immunhistochemische Kofärbung von CEACAM1 (rot) und MBP (grün), an p11 - Mesencephalon .....	53
Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Färbung von Oligodendrozytenkulturen zu jeweils unterschiedlichen Differenzierungsstadien (24h, 48h und 72h) .....	56
Abbildung 13: Expression der transmembranären CEACAM1-L-Isoform auf RNA-Ebene in Hemisphäre und Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11 im Rahmen des Hyperoxie/LPS-Schadensmodells .....	58
Abbildung 14: Expression der transmembranären CEACAM1-S-Isoform auf RNA-Ebene in Hemisphäre und Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11 im Rahmen des Hyperoxie/LPS-Schadensmodells .....	59
Abbildung 15: Expression der löslichen CEACAM1-4C2-Isoform auf RNA-Ebene in Hemisphäre und Cortex zu den Zeitpunkten p6 und p11 im Rahmen des Hyperoxie/LPS-Schadensmodells. ....	60
Abbildung 16: Axin2 und beta-Catenin - Analyse der Expression des Wnt-Signalweges auf RNA-Ebene.....	62
Abbildung 17: MyD88, Ticam2, Traf6 - Analyse der Expression des TLR2-und TLR4-Signalweges auf RNA-Ebene.....	64

### 8.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Histologie.....	26
Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Molekularbiologie .....	27
Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Zellbiologie .....	27
Tabelle 4: Chemikalien und Pharmaka .....	29
Tabelle 5: Verwendete Antikörper.....	31
Tabelle 6: Verwendete Primer .....	32
Tabelle 7: Einteilung der Versuchstiere.....	33
Tabelle 8: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie .....	37
Tabelle 9: SYBR Green®-Mastermix, verwendet für folgende Gene: Axin2, Beta-Catenin, CEACAM1 -4C2, MyD88, Ticam2, Traf6 und Referenzgen Ubiquitin C .....	45
Tabelle 10: TaqMan®-Mastermix, verwendet für folgende Gene: CEACAM1-L und CEACAM1-S .....	45
Tabelle 11: Tabellarische Auflistung der genutzten Bildbearbeitungssoftware.....	50
Tabelle 12: Anzahl der Versuchstiere für die jeweiligen Regionen zu den Zeitpunkten p6 und p11. ....	66

## 8.4 TABELLEN/WERTE ZUR GENANALYSE

Hemisphäre p6					
Tier	Therapie	Therapie Code	CEACAM1-L	CEACAM1-S	CEACAM1-4C2
CE-05 #20	NO/NaCl	1	1.014819978	1.007019647	1.076151671
CE-05 #21	NO/NaCl	1	0.94631665	0.933374895	1.002533515
CE-05 #22	NO/NaCl	1	0.978441636	1.013631858	0.91783082
CE-05 #23	NO/NaCl	1	1.066746758	1.051243814	1.014550497
CE-09 #01	NO/NaCl	1	1.065314769	1.004456203	0.965636192
CE-09 #02	NO/NaCl	1	1.09674288	0.943745152	1.014894113
CE-09 #03	NO/NaCl	1	0.857734645	1.063141607	1.032718534
CE-12 #01	NO/NaCl	1	0.906575758	0.986904393	1.167807657
CE-12 #02	NO/NaCl	1	0.768405678	0.937454829	1.012349054
CE-12 #03	NO/NaCl	1	1.436496395	1.081167214	0.852365363
CE-05 #25	NO/LPS	2	1.232358169	1.113798231	1.726970129
CE-05 #26	NO/LPS	2	1.460162382	1.416337715	1.668058854
CE-05 #27	NO/LPS	2	1.057421776	1.103918809	1.258508186
CE-05 #28	NO/LPS	2	1.227010375	0.997740847	1.231292319
CE-09 #04	NO/LPS	2	0.871365728	1.063583761	1.145254479
CE-09 #05	NO/LPS	2	1.043540529	1.115859306	1.128277444
CE-09 #06	NO/LPS	2	1.146394048	1.191048079	1.684762531

CE-12 #04	NO/LPS	2	0.69179198	0.888017089	0.866255444
CE-12 #05	NO/LPS	2	0.984005456	1.016535505	1.582924387
CE-12 #06	NO/LPS	2	0.823151818	1.016485299	1.010253916
CE-05 #29	HO/NaCl	3	1.145244313	0.995930926	1.757570728
CE-05 #30	HO/NaCl	3	0.923089552	0.896898113	1.306124764
CE-05 #31	HO/NaCl	3	1.01070797	1.044218699	1.827352483
CE-05 #32	HO/NaCl	3	1.332375544	1.154197146	1.147287317
CE-09 #07	HO/NaCl	3	0.848848313	0.917173547	1.113131613
CE-09 #08	HO/NaCl	3	0.948664315	1.138411409	1.470799566
CE-09 #09	HO/NaCl	3	1.201082708	1.256534714	1.412718313
CE-12 #07	HO/NaCl	3	0.886464506	0.885547477	0.654875214
CE-12 #08	HO/NaCl	3	0.766532775	0.938295941	0.882381697
CE-12 #09	HO/NaCl	3	0.90765525	0.986961724	0.877965645
CE-05 #33	HO/LPS	4	1.172536246	1.097654176	1.486467897
CE-05 #34	HO/LPS	4	1.0286944	1.02160573	1.82931719
CE-05 #35	HO/LPS	4	1.101250438	1.154554428	2.021668898
CE-05 #36	HO/LPS	4	1.11334648	1.146284692	1.539235577
CE-09 #10	HO/LPS	4	0.993355128	1.00937406	1.454223429
CE-09 #11	HO/LPS	4	0.94449333	1.023521623	1.679018114
CE-09 #12	HO/LPS	4	1.263878134	1.361713285	1.863450937
CE-12 #10	HO/LPS	4	1.030423038	0.948707729	0.821634117
CE-12 #11	HO/LPS	4	0.96785135	1.038219076	0.942124754

CE-12 #12	HO/LPS	4	1.190514595	1.085685512	1.215939933					
Mittelwerte der Therapiegruppen										
		1	1.013759515	1.002213961	1.005683742					
		2	1.053720226	1.092332464	1.330255769					
		3	0.997066525	1.02141697	1.245020734					
		4	1.080634314	1.088732031	1.485308085					
Standardabweichung der Therapiegruppen										
		1	0.171139107	0.05009367	0.080639346					
		2	0.214034843	0.133749585	0.294731975					
		3	0.167139009	0.11861556	0.364157223					
		4	0.099841873	0.109300932	0.373963504					
<b>p11</b>										
Tier	Therapie	Therapie Code	CEACAM1-L	CEACAM1-S	CEACAM1-4C2	Axin2	beta-Catenin	Traf6	MyD88	Ticam2
CE-18 #14	NO/NaCl	1	0.94329558	1.00271101	1.153547787	1.04352156	0.92007471	1.07752417	1.00033036	1.02725809
CE-18 #15	NO/NaCl	1	1.06878301	1.04886464	0.889194982	0.96497603	0.95947023	0.97652117	1.08275553	0.98678882
CE-18 #16	NO/NaCl	1	0.87622184	1.0355167	1.07462259	1.14250258	1.13525447	1.0236173	1.05102044	1.06770919
CE-18 #17	NO/NaCl	1	0.87256095	0.90857626	1.160604499	0.82341717	0.81668504	0.8582974	0.74747023	0.7391228
CE-18 #18	NO/NaCl	1	1.14789244	0.97391611	0.845802229	1.03127919	1.117177	1.06123155	1.1279513	1.0690034
CE-18 #19	NO/NaCl	1	1.14237418	1.04221918	1.015034289	1.02203954	1.11033712	1.04247496	1.06156099	1.1901273
CE-21 #02	NO/NaCl	1	0.95445651	0.92189922	0.85376346	0.94366836	0.92844924	0.82454454	0.79924283	0.87187211
CE-21 #03	NO/NaCl	1	1.0545433	1.09786536	1.193205665	1.06188991	1.09240469	1.23317199	1.25255122	1.15777872
CE-18 #20	NO/LPS	2	1.22604782	1.08548026	0.971603092	1.12017267	1.12947854	1.17414052	1.18892207	1.08770799
CE-18 #21	NO/LPS	2	1.14560361	0.94729221	1.62797108	0.9105679	1.03209697	1.06166824	1.00520015	1.0456512
CE-18 #22	NO/LPS	2	1.27169202	1.08321001	1.225175026	1.123014	1.02979206	1.05420551	1.32514409	1.29883122
CE-18 #24	NO/LPS	2	1.29489882	1.1192806	1.231686064	1.07187328	1.15648794	1.1560434	1.12441599	1.18287457
CE-18 #25	NO/LPS	2	1.34119075	1.06169737	1.196104737	1.14352023	1.09007915	1.06336717	1.04282532	1.07278734

CE-18 #26	NO/LPS	2	1.32843059	1.22712349	1.486823095	1.03594421	1.10940345	1.00904845	1.07113516	1.13679179																																																								
CE-21 #05	NO/LPS	2	1.1660632	1.18909504	1.686378316	0.88491991	1.05698453	1.07728803	0.93756927	1.13053877																																																								
CE-21 #06	NO/LPS	2	1.29302349	1.20717841	2.095569079	1.15427169	1.22825278	1.20891128	1.0580769	1.25822657																																																								
CE-18 #01	HO/NaCl	3	1.314206	1.08996533	0.556737416	0.80066278	0.64746472	0.7633394	0.7562231	0.85914771																																																								
CE-18 #02	HO/NaCl	3	1.17602476	0.88706622	0.575100722	0.94135298	0.92244299	0.95204808	0.96199569	0.89035455																																																								
CE-18 #03	HO/NaCl	3	1.24499643	0.95522794	0.589817107	1.06675846	1.05960946	1.08773277	1.10645473	1.06972157																																																								
CE-18 #04	HO/NaCl	3	1.11449324	0.84658497	0.564094495	1.19858241	1.28162488	1.15736946	1.15788499	1.09213568																																																								
CE-18 #05	HO/NaCl	3	1.33238481	0.98268225	0.700811485	1.08415075	1.1672299	1.09204798	1.06259284	1.00575545																																																								
CE-18 #06	HO/NaCl	3	1.38924886	1.11918071	0.495736403	1.00654609	1.14865669	0.99461404	1.02886489	0.96925959																																																								
CE-18 #07	HO/NaCl	3	1.19280843	0.86522406	0.648067334	1.0327413	1.10457268	0.93335403	1.11156615	1.01904962																																																								
CE-21 #08	HO/NaCl	3	1.19251747	1.13243963	1.136419765	0.89893137	1.11255948	1.14773065	1.00155853	1.10546646																																																								
CE-21 #09	HO/NaCl	3	1.29271499	1.12745673	1.206096682	1.05429915	1.09390699	1.09721861	0.89402655	1.27971728																																																								
CE-18 #08	HO/LPS	4	1.09825724	0.99218109	0.676624888	0.90547231	0.8253549	0.90944098	0.95287774	0.98602905																																																								
CE-18 #09	HO/LPS	4	1.41916938	1.06203324	0.670276457	0.92488881	0.84566066	0.82447907	0.90971285	0.89591146																																																								
CE-18 #11	HO/LPS	4	1.45547708	1.17575401	0.644465407	0.99195991	0.87420998	0.81465434	0.93497118	0.87013028																																																								
CE-18 #12	HO/LPS	4	1.28668115	1.11059317	0.734636642	1.03721537	1.00229191	0.99643392	1.05147362	0.98163806																																																								
CE-18 #13	HO/LPS	4	1.35701362	1.03164383	0.964534394	1.17127769	1.10766918	0.97919895	0.90671407	1.06352804																																																								
CE-21 #11	HO/LPS	4	1.48211898	1.24295841	2.165071568	0.88577329	0.93039899	0.90446932	0.78417804	1.05219044																																																								
CE-21 #12	HO/LPS	4	1.24654646	1.20905083	1.898454471	0.84312112	0.71458421	0.86901566	0.79885421	0.99708422																																																								
<table border="1"> <tbody> <tr><td rowspan="4">Mittelwerte der Therapie- gruppen</td><td>1</td><td>1.00751598</td><td>1.00394606</td><td>1.023221938</td><td>1.00416179</td><td>1.00998156</td><td>1.01217289</td><td>1.01536036</td><td>1.01370755</td></tr> <tr><td>2</td><td>1.25836879</td><td>1.11504468</td><td>1.440163811</td><td>1.05553549</td><td>1.10407193</td><td>1.10058408</td><td>1.09416112</td><td>1.15167618</td></tr> <tr><td>3</td><td>1.24993278</td><td>1.00064754</td><td>0.719209045</td><td>1.00933614</td><td>1.05978531</td><td>1.02505056</td><td>1.00901861</td><td>1.03228977</td></tr> <tr><td>4</td><td>1.3350377</td><td>1.11774494</td><td>1.107723404</td><td>0.96567264</td><td>0.90002426</td><td>0.89967032</td><td>0.90554024</td><td>0.97807308</td></tr> <tr><td rowspan="2">Standard- abweichung der</td><td>1</td><td>0.10383164</td><td>0.06126832</td><td>0.1349164</td><td>0.08869785</td><td>0.1110713</td><td>0.1207893</td><td>0.15635788</td><td>0.13886889</td></tr> <tr><td>2</td><td>0.06778826</td><td>0.0861873</td><td>0.33474308</td><td>0.09810548</td><td>0.06319925</td><td>0.06537685</td><td>0.11188768</td><td>0.0838197</td></tr> </tbody> </table>											Mittelwerte der Therapie- gruppen	1	1.00751598	1.00394606	1.023221938	1.00416179	1.00998156	1.01217289	1.01536036	1.01370755	2	1.25836879	1.11504468	1.440163811	1.05553549	1.10407193	1.10058408	1.09416112	1.15167618	3	1.24993278	1.00064754	0.719209045	1.00933614	1.05978531	1.02505056	1.00901861	1.03228977	4	1.3350377	1.11774494	1.107723404	0.96567264	0.90002426	0.89967032	0.90554024	0.97807308	Standard- abweichung der	1	0.10383164	0.06126832	0.1349164	0.08869785	0.1110713	0.1207893	0.15635788	0.13886889	2	0.06778826	0.0861873	0.33474308	0.09810548	0.06319925	0.06537685	0.11188768	0.0838197
												Mittelwerte der Therapie- gruppen	1	1.00751598	1.00394606	1.023221938	1.00416179	1.00998156	1.01217289	1.01536036	1.01370755																																													
													2	1.25836879	1.11504468	1.440163811	1.05553549	1.10407193	1.10058408	1.09416112	1.15167618																																													
													3	1.24993278	1.00064754	0.719209045	1.00933614	1.05978531	1.02505056	1.00901861	1.03228977																																													
											4		1.3350377	1.11774494	1.107723404	0.96567264	0.90002426	0.89967032	0.90554024	0.97807308																																														
											Standard- abweichung der	1	0.10383164	0.06126832	0.1349164	0.08869785	0.1110713	0.1207893	0.15635788	0.13886889																																														
												2	0.06778826	0.0861873	0.33474308	0.09810548	0.06319925	0.06537685	0.11188768	0.0838197																																														

		3	0.08337267	0.11197158	0.248200418	0.10936252	0.17110159	0.1198802	0.11777126	0.11857198
		4	0.12531883	0.0875988	0.596986638	0.10335307	0.1183717	0.06505782	0.08496474	0.06722621

Cortex p6										
Tier:	Therapie:	Therapie Code:	CEACAM1-L	CEACAM1-S	CEACAM1-4C2	Axin2	beta-Catenin	Traf6	MyD88	Ticam2
CE-15 CX #01	NO/NaCl	1	0.904513183	1.06818845	0.986913034	1.108740733	1.00363301	1.027757288	1.003654483	1.127471477
CE-15 CX #02	NO/NaCl	1	0.854183063	0.848987902	0.854472073	0.997006762	1.068648758	1.051812281	1.024732367	1.056251059
CE-15 CX #03	NO/NaCl	1	1.297296659	1.126923385	1.229957138	0.905344556	0.932825305	0.925062759	0.972311264	0.839706043
CE-17 CX #01	NO/NaCl	1	1.021295127	0.904513183	1.2282134	1.101907563	1.051448015	1.106599689	0.892444197	1.113970862
CE-17 CX #02	NO/NaCl	1	0.904002768	0.854183063	0.835624705	1.02221604	1.028406305	1.025925714	1.098107023	0.870992114
CE-17 CX #03	NO/NaCl	1	1.090568815	1.297296659	0.978880604	0.887793876	0.92479924	0.880832927	1.020408955	1.03089402
CE-15 CX #07	NO/LPS	2	0.718032372	0.67185661	1.249965234	1.010058073	1.119247925	0.934943188	0.869757666	1.010133797
CE-15 CX #08	NO/LPS	2	0.787909876	0.863412995	0.890714173	1.160806277	1.135053989	1.060477678	1.126811582	0.945098852
CE-15 CX #09	NO/LPS	2	0.835485352	0.81962001	0.769438802	1.239834324	1.203369768	1.176854593	1.261103425	1.02854069
CE-17 CX #04	NO/LPS	2	0.751741054	0.718032372	0.679065411	1.091386101	1.221645205	0.998608826	1.177860905	1.394552412
CE-17 CX #05	NO/LPS	2	0.803070213	0.787909876	1.025588599	1.091666058	1.296047119	1.023702355	1.166188595	1.198159565
CE-17 CX #06	NO/LPS	2	0.736179118	0.835485352	0.716177802	1.073828184	1.186142361	0.912633677	1.164443831	1.267067521
CE-15 CX #13	HO/NaCl	3	1.380676965	1.356674998	0.875918427	0.994077079	0.714989166	0.872900211	0.887479569	0.81118665
CE-15 CX #14	HO/NaCl	3	1.025538012	1.046221308	1.538192299	0.907153724	0.941397673	0.99578642	0.83925951	0.817763682
CE-15 CX #15	HO/NaCl	3	1.058047333	1.440959406	2.527447909	0.993784653	1.089911554	1.099239267	0.899247802	0.935159935
CE-17 CX #07	HO/NaCl	3	1.122560233	1.380676965	1.382927662	1.116903769	0.910703602	0.98329329	1.389545917	1.106166495
CE-17 CX #08	HO/NaCl	3	0.786251052	1.025538012	1.051369868	0.988409649	0.95050539	1.093066918	1.176542677	1.081324247

CE-17 CX #09	HO/NaCl	3	0.889062689	1.058047333	1.419908299	1.045935282	1.192802176	1.208672339	1.149303803	1.057544086
CE-15 CX #19	HO/LPS	4	0.851303449	1.636550071	3.190621091	1.043378955	1.086622243	0.994056726	0.907465751	0.914860095
CE-15 CX #20	HO/LPS	4	0.931832465	0.790622523	2.141660955	0.875755386	1.047239367	1.077991161	0.753461895	0.91669434
CE-15 CX #21	HO/LPS	4	0.754675072	1.101343213	2.607506188	1.104664507	1.127149703	1.143149796	1.023017987	1.31225047
CE-17 CX #10	HO/LPS	4	0.677732502	0.851303449	1.087729355	1.085389382	1.147305927	1.057471557	1.222891895	1.165606731
CE-17 CX #11	HO/LPS	4	0.683412166	0.931832465	1.18202835	1.19024838	1.33818708	0.991477421	1.171403753	1.092993978
CE-17 CX #12	HO/LPS	4	0.715713519	0.754675072	1.795823208	1.146441411	1.221151083	1.052666905	1.170447061	1.155433889

Mittelwerte der Therapiegruppen	1	1.011976603	1.016682107	1.019010159	1.003834922	1.001626772	1.002998443	1.001943048	1.006547596
	2	0.772069664	0.782719536	0.88849167	1.111263169	1.193584394	1.017870053	1.127694334	1.140592139
	3	1.043689381	1.21801967	1.465960744	1.007710693	0.96671826	1.042159741	1.056896546	0.968190849
	4	0.769111529	1.011054465	2.000894858	1.074313003	1.161275901	1.052802261	1.041448057	1.092973251

Standard-abweichung der Therapiegruppe	1	0.150430849	0.163635633	0.158959238	0.085803883	0.055274139	0.076651868	0.061885409	0.112128586
	2	0.04052758	0.0672796	0.198825156	0.072351061	0.058293618	0.087032623	0.122255953	0.158954072
	3	0.187305799	0.176795473	0.526153217	0.063571864	0.149275859	0.106333274	0.197665972	0.121236778
	4	0.093084085	0.301527765	0.747184592	0.100057868	0.09558579	0.05168938	0.167171592	0.141455531

**p11**

Tier	Therapie	Therapie Code	CEACAM1-L	CEACAM1-S	Axin2	beta-Catenin	Traf6	MyD88	Ticam2
CE-16-19 Cx	NO/NaCl	1	0.85725394	1.007991878	1.042544855	0.922543248	1.025115953	1.037602348	0.937562461
CE-16-20 Cx	NO/NaCl	1	1.085341093	1.005952876	1.008255812	0.939436288	0.958457852	1.03070931	1.051041551
CE-16-21 Cx	NO/NaCl	1	1.076426889	0.907371575	0.974394215	1.258000011	1.062229323	0.91103035	0.965728705
CE-18-17 Cx	NO/NaCl	1	1.003671206	1.021435254	0.945226591	1.011246755	0.971293047	0.937575996	1.054448088
CE-18-18 Cx	NO/NaCl	1	0.998413153	1.106805978	1.084231564	1.071090545	1.056262623	1.092353872	1.028016844

CE-18-19 Cx	NO/NaCl	1	1.00808547	0.946552828	0.953357831	0.85500661	0.954008424	0.962818461	0.853734372
CE-16-26 Cx	NO/LPS	2	1.005651979	0.929284992	NA	NA	NA	NA	NA
CE-16-28 Cx	NO/LPS	2	1.342569605	1.159300189	1.189260838	1.960531487	1.29684856	0.909155602	1.033291043
CE-18-24 Cx	NO/LPS	2	0.976093379	1.06825088	1.095525067	1.234168981	1.054712957	0.834688555	0.986924154
CE-18-25 Cx	NO/LPS	2	1.262662639	1.312911383	0.857649184	0.958550733	0.939900332	0.965551254	1.112620187
CE-18-26 Cx	NO/LPS	2	1.156317161	1.240754214	1.326330943	1.383806634	1.031818454	0.850444985	1.483750755
CE-16-05 Cx	HO/NaCl	3	0.9059479	1.056800136	0.995972044	1.039780612	0.900393195	1.066041613	0.9710916
CE-16-06 Cx	HO/NaCl	3	1.225377341	1.074664757	1.353674977	1.213292441	1.23734403	1.345730079	1.475210868
CE-16-07 Cx	HO/NaCl	3	1.071325607	0.967004183	1.739688586	1.228274287	1.360125608	1.635571692	1.440993995
CE-18-04 Cx	HO/NaCl	3	1.469783791	1.298184945	0.929636843	0.98681148	1.071660397	1.0350892	1.035779136
CE-18-05 Cx	HO/NaCl	3	1.279125561	1.076673437	0.984744092	1.079739751	0.934578558	0.848875157	0.949080455
CE-18-06 Cx	HO/NaCl	3	1.014131032	1.144619047	1.280546276	1.231562685	0.996560166	0.569107328	1.021875533
CE-18-07 Cx	HO/NaCl	3	0.767921155	0.643835972	1.107063585	1.191301772	0.879075575	0.809980398	0.982503344
CE-16-12 Cx	HO/LPS	4	1.013296747	0.981393305	0.871728494	0.986367678	0.88810409	0.74476503	0.92544146
CE-16-13 Cx	HO/LPS	4	NA	NA	1.059123482	1.042929592	0.980849435	1.108454505	0.987361866
CE-16-14 Cx	HO/LPS	4	1.205949852	1.301785617	NA	NA	NA	NA	NA
CE-18-12 Cx	HO/LPS	4	1.208410073	1.408416027	1.280733007	1.29721515	1.047240126	0.913849432	1.167667253
CE-18-13 Cx	HO/LPS	4	1.37515979	1.558425876	1.358283117	1.653761924	1.075770167	0.793001802	1.330905258
Mittelwerte der Therapiegruppen		1	1.004865292	0.999351732	1.001335145	1.009553909	1.004561204	0.99534839	0.981755337
		2	1.148658953	1.142100331	1.117191508	1.384264459	1.080820076	0.889960099	1.154146535
		3	1.10480177	1.037397496	1.198760915	1.138680432	1.054248218	1.04434221	1.125219276
		4	1.200704116	1.312505206	1.142467025	1.245068586	0.997990954	0.890017692	1.102843959
Standard-abweichung der Therapiegruppe		1	0.074654709	0.062450511	0.049655074	0.130311993	0.045109163	0.063181264	0.071675395
		2	0.142046965	0.134126022	0.170854429	0.366007079	0.131917987	0.05171769	0.195533088
		3	0.220555265	0.186187447	0.264859167	0.093586847	0.16877449	0.329485411	0.212480358
		4	0.128104648	0.21179345	0.191010187	0.263408353	0.072187328	0.140350465	0.158919615

## 8.5 DANKSAGUNG

Da eine wissenschaftliche Arbeit nie das Werk einer einzigen Person ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei denjenigen bedanken, die mich in dieser herausfordernden Phase meiner akademischen Laufbahn unterstützt und begleitet haben.

Ein außerordentlich besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser, für die Möglichkeit diese Dissertation in ihrer Abteilung mit diesem interessanten Forschungsthema anzufertigen. Durch die Aufmunterungen und Unterstützung, wenn die Ergebnisse auf sich warten ließen, gedieh stets neue Motivation für die Arbeit.

Als mein Betreuer dieser Arbeit hat mich Dr. med. Sebastian Prager kontinuierlich mit seinen Anregungen und zielführenden Diskussionen unterstützt. Ich bedanke mich hier insbesondere für die unermüdliche Geduld bei der Auswertung, den frustrierenden Ergebnissen und bei jeder Schreibblockade.

Ich danke meinem Laborleiter Prof. Dr. Ivo Bendix und all meinen Kollegen des neonatologischen Forschungslabors der Kinderklinik I, mit denen ich die Zeit im Labor verbringen durfte für die Unterstützung, wundervolle Arbeitsatmosphäre, für die bereichernden Tipps und Arbeitsanregungen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für das Verständnis sowie die liebevolle Fürsorge bedanken.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei Onur für den festen Glauben an mich und die seelische Unterstützung bedanken. Ohne ihn wäre diese Dissertation nicht zu dem Werk geworden, welches es heute ist.

## **8.6 LEBENSLAUF**

**DER LEBENSLAUF IST IN DER ONLINE-VERSION AUS GRÜNDEN DES DATENSCHUTZES NICHT ENHALTEN**

**DER LEBENSLAUF IST IN DER ONLINE-VERSION AUS GRÜNDEN DES DATENSCHUTZES NICHT ENHALTEN**