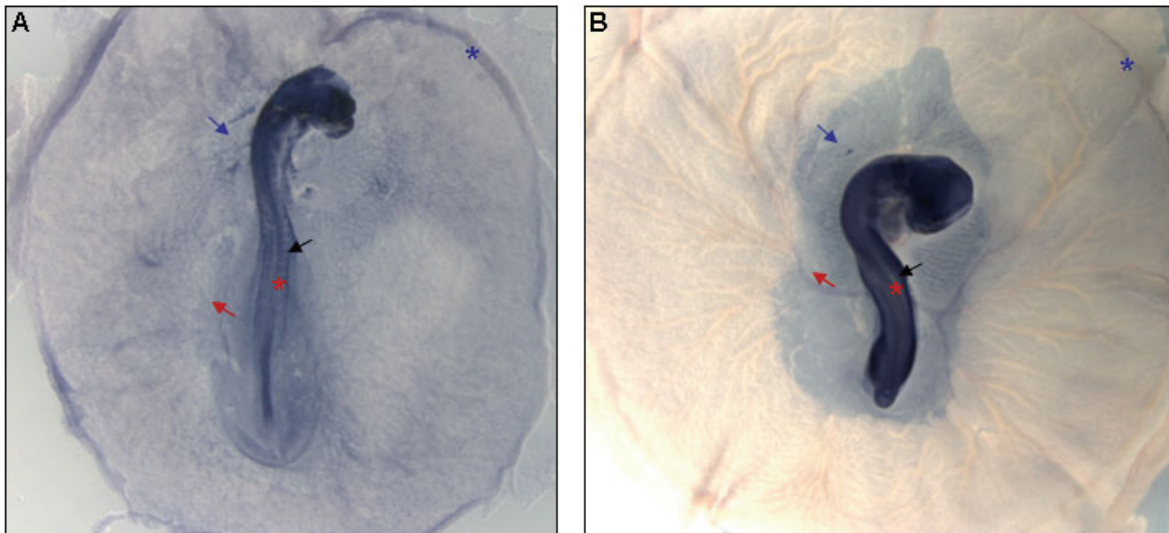


### 3. ERGEBNISSE

#### A EXPRESSION UND REGULATION VON CONNEXINEN

##### 3.1 Vaskuläre Expressionsmuster von Connexin 37, 40 und 43

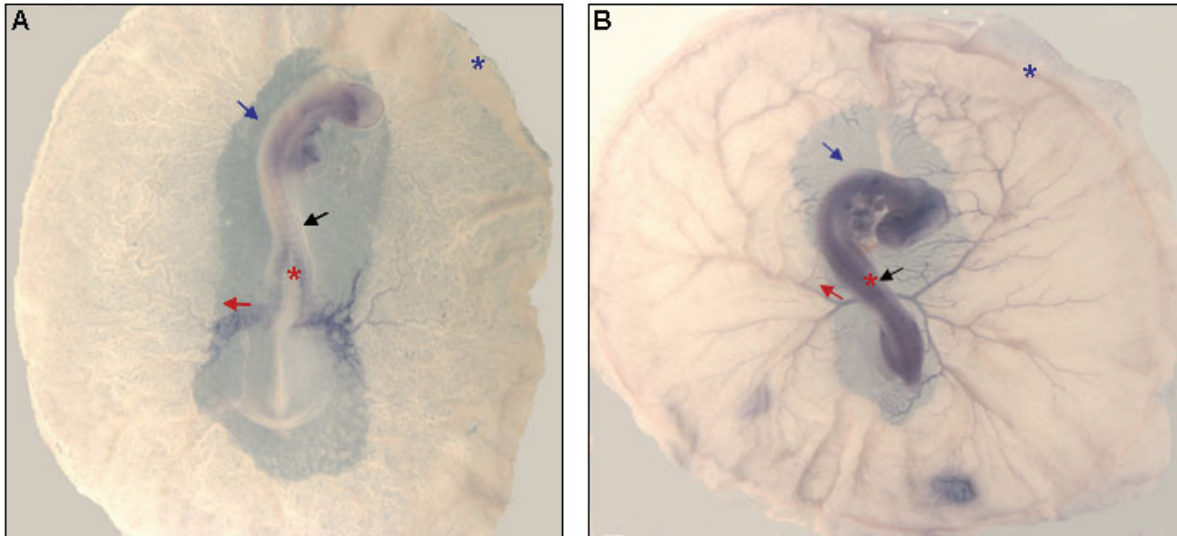
Abbildung 9 zeigt *in situ* Hybridisierungen gegen Cx43-RNA in zwei und drei Tage alten Hühnerembryonen. Die extraembryonalen Gefäße weisen nur eine schwache Färbung für Cx43 auf (s. Abb. 9 und 11 im Vergleich). Während die Vitellin-Arterie keine bzw. nur eine Färbung der proximalen Segmente zeigt, weisen die Venen der Area pellucida um den Embryo eine gleichmäßige Expression auf. Der Sinus terminalis ist zu keinem Zeitpunkt spezifisch gefärbt, es ist nur Hintergrund-Färbung zu sehen. Im Embryo sind die intersomitischen Gefäße und die dorsale Aorta gefärbt.



**Abbildung 9:** *In situ* Hybridisierung gegen Cx43-RNA. Zwei (A) und drei (B) Tage alte Hühnerembryonen. Rote und blaue Pfeile zeigen die Richtung der arteriellen bzw. venösen Blutströmung. *roter Pfeil:* Vitellin-Arterie, *roter Stern:* dorsale Aorta, *blauer Pfeil:* Venen der Area pellucida, *blauer Stern:* Sinus terminalis, *schwarzer Pfeil:* intersomitische Gefäße.

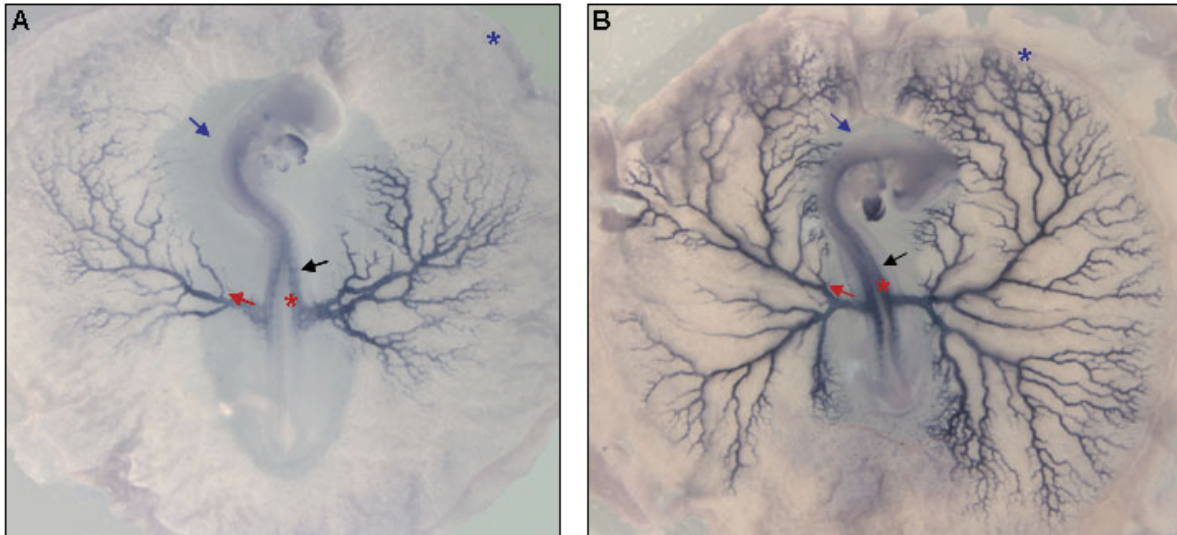
In Abbildung 10 sind *in situ* Hybridisierungen gegen Cx37-RNA in zwei und drei Tage alten Hühnerembryonen zu sehen. Kurz nach Beginn der Blutzirkulation ist eine Färbung der proximalen Segmente der Vitellin-Arterie zu erkennen, die mit zunehmender Entwicklung auch distalere Segmente mit einbezieht. Die Venen der Area pellucida sowie der Sinus terminalis weisen zu keinem Zeitpunkt Expression von Cx37

auf, eine leichte Färbung in Abbildung B ist als Hintergrund-Färbung anzusehen. Zusätzlich sind die intersomitischen Gefäße und die dorsale Aorta im Embryo gefärbt.



**Abbildung 10:** *In situ* Hybridisierung gegen Cx37-RNA. Zwei (A) und drei (B) Tage alte Hühnerembryonen. Rote und blaue Pfeile verdeutlichen die Richtung der arteriellen bzw. venösen Blutströmung. *roter Pfeil:* Vitellin-Arterie, *roter Stern:* dorsale Aorta, *blauer Pfeil:* Venen der Area pellucida, *blauer Stern:* Sinus terminalis, *schwarzer Pfeil:* intersomitische Gefäße.

Abbildung 11 zeigt *in situ* Hybridisierungen gegen Cx40-RNA in zwei und drei Tage alten Hühnerembryonen. Schon kurz nach Beginn der Blutzirkulation ist eine weit distal reichende Färbung der Vitellin-Arterie zu erkennen, die mit zunehmender Entwicklung auch die distalsten Verzweigungen mit einbezieht. Die Venen der Area pellucida sowie der Sinus terminalis weisen zu keinem Zeitpunkt Expression von Cx40 auf. Zusätzlich sind die intersomitischen Gefäße und die dorsale Aorta im Embryo gefärbt.

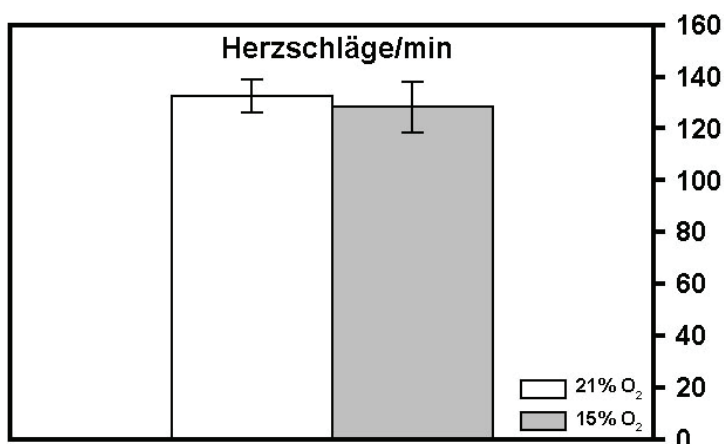


**Abbildung 11:** *In situ* Hybridisierung gegen Cx40-RNA. Zwei (A) und drei (B) Tage alte Hühnerembryonen. Rote und blaue Pfeile verdeutlichen die Richtung der arteriellen bzw. venösen Blutströmung. *roter Pfeil:* Vitellin-Arterie, *roter Stern:* dorsale Aorta, *blauer Pfeil:* Venen der Area pellucida, *blauer Stern:* Sinus terminalis, *schwarzer Pfeil:* intersomitische Gefäße.

### 3.2 Regulation der Connexin-Expression

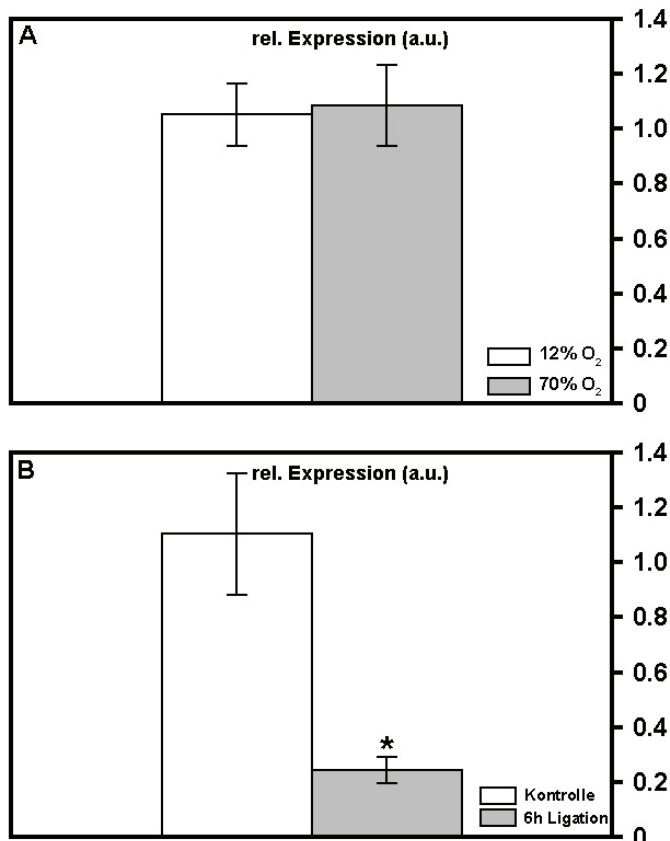
#### 3.2.1 Sauerstoff als potentieller Regulator der Connexin-Expression

Abbildung 12 vergleicht Herzfrequenzen von unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bebrüteten drei Tage alten Hühnerembryonen. Die hypoxischen Hühnerembryonen weisen keine signifikanten Änderungen der Herzfrequenz auf.



**Abbildung 12:** Herzfrequenzen drei Tage alter, unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (15% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubierter, Hühnerembryonen (n = 7). Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor (p > 0,05).

In Abbildung 13 ist das Expressionsniveau von Cx40 in Dottersäcken drei Tage alter Hühnerembryonen zu sehen. Unter hypoxischen (12% O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (70% O<sub>2</sub>) Bedingungen bebrütete Hühnerembryonen zeigen keine Unterschiede im Expressionsniveau (A). Sechs Stunden nach Ligatur der arteriellen Blutströmung auf einer Seite des Dottersackes ist die Expression von Cx40 im Vergleich zur Gegenseite (Kontrolle) um mehr als den Faktor 4,5 gesunken (B).



**Abbildung 13:**

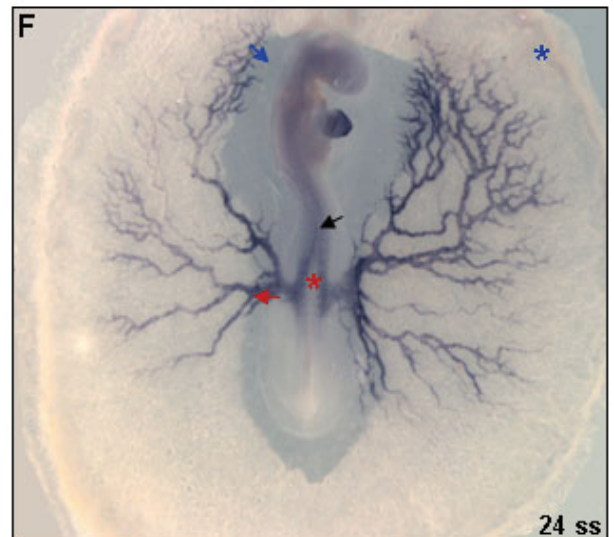
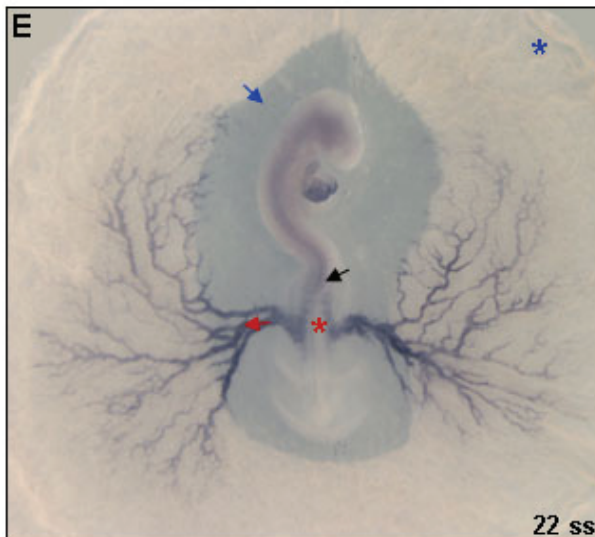
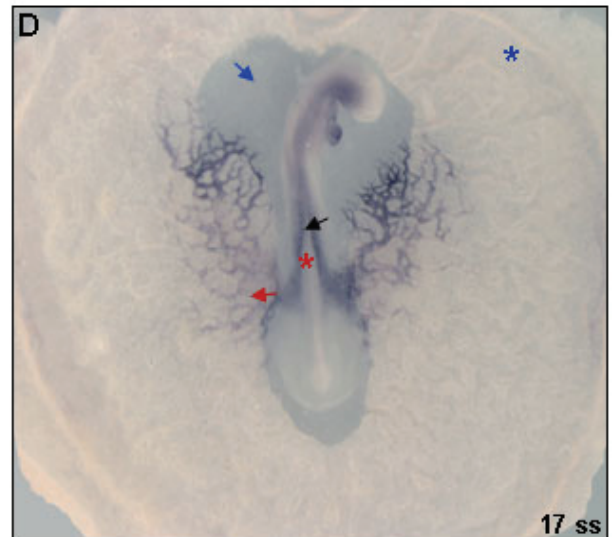
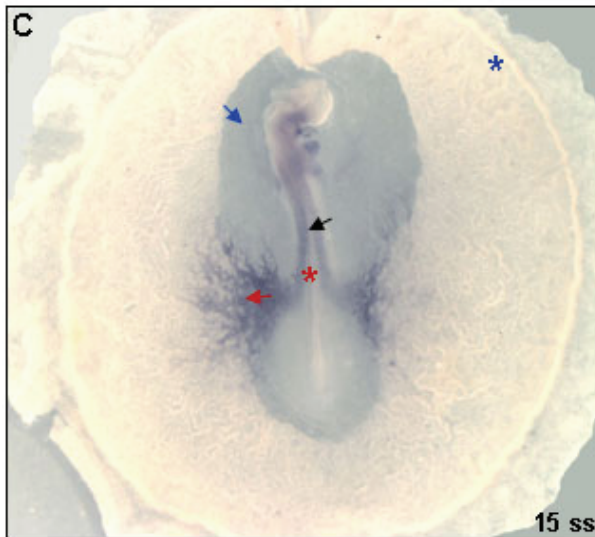
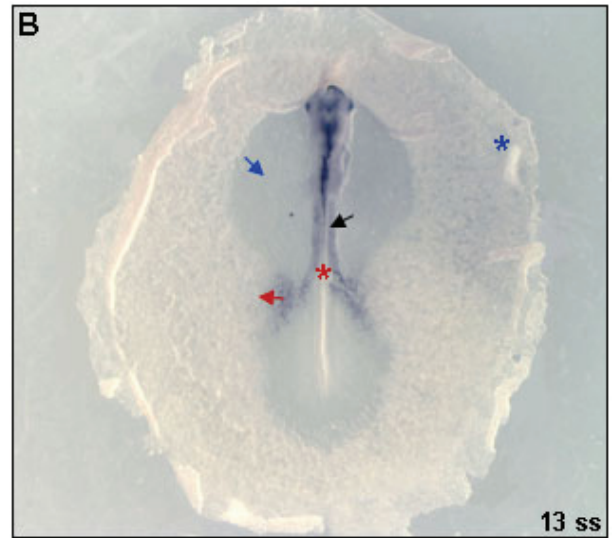
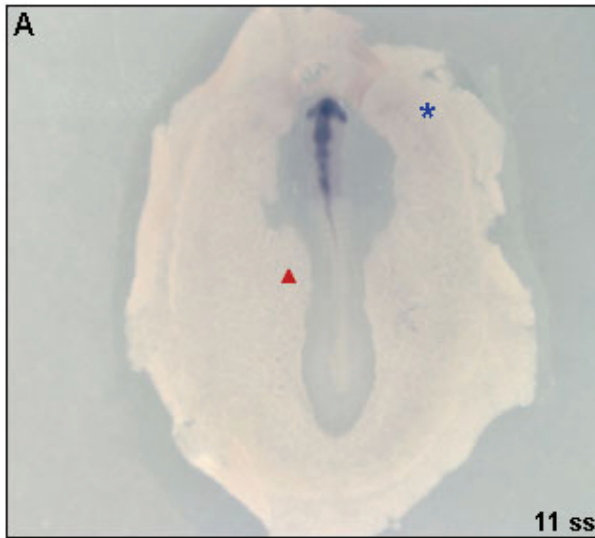
(A) Connexin 40- Expression im Dottersack drei Tage alter, unter hypoxischen (12% O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (70% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubierter, Hühnerembryonen (n = 8).

(B) Connexin 40- Expression in ligierten Dottersäcken drei Tage alter Hühnerembryonen (n = 6). Der Unterschied ist signifikant (p < 0,05).

### 3.2.2 Blutströmung als potentieller Regulator der Connexin-Expression

Abbildung 14 zeigt *in situ* Hybridisierungen gegen Cx40-RNA in Hühnerembryonen im Alter zwischen ein bis zwei Tagen.

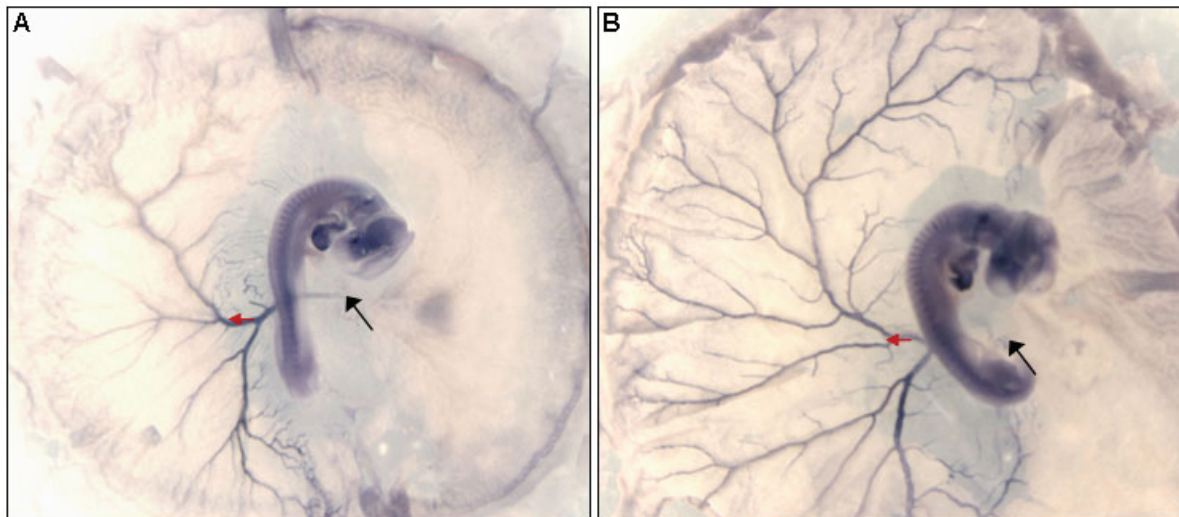
Vor Beginn der Blutzirkulation zeigt der arterielle Gefäßpol keine Expression von Cx40. Nach Einsetzen der Perfusion ist Cx40- Expression sichtbar, die sich mit zunehmender Entwicklung immer weiter nach distal ausdehnt. Es ist außerdem eine Färbung der intersomitischen Gefäße und der dorsalen Aorta zu erkennen. Zu keinem Zeitpunkt sind venöse Gefäße gefärbt.



**Abbildung 14:** *In situ* Hybridisierung gegen Cx40-RNA im Entwicklungsverlauf.

Ein bis zwei Tage alte Hühnerembryonen vor (A) und nach Einsetzen der Perfusion (B bis F). Rote und blaue Pfeile verdeutlichen die Richtung der arteriellen bzw. venösen Blutströmung. *rotes Dreieck:* arterieller Gefäßpol, *roter Pfeil:* Vitellin-Arterie, *roter Stern:* dorsale Aorta, *blauer Pfeil:* Venen der Area pellucida, *blauer Stern:* Sinus terminalis, *schwarzer Pfeil:* intersomitische Gefäße.

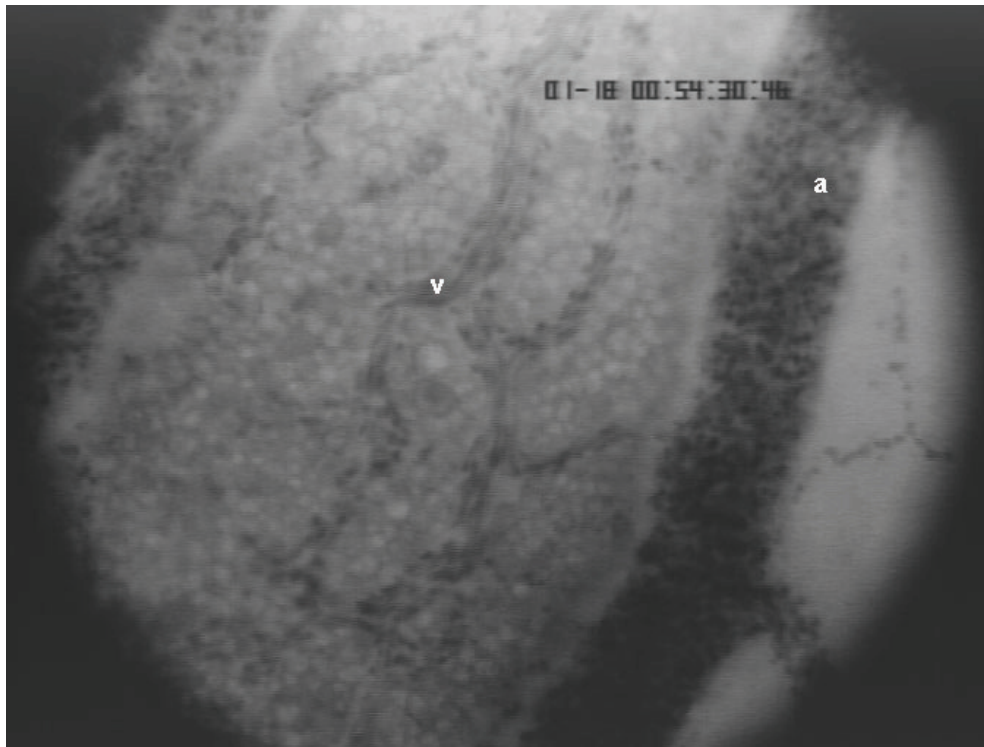
Abbildung 15 zeigt *in situ* Hybridisierungen gegen Cx40-RNA in 2,5 und 3,5 Tage alten Hühnerembryonen nach Ligatur der rechten Vitellin-Arterie. Sechs Stunden nach Unterbrechung der arteriellen Blutströmung ist in der rechten Vitellin-Arterie keine Cx40-Expression mehr zu erkennen. 24 Stunden nach Ligatur ist außerdem eine Größenzunahme der linken Vitellin-Arterie festzustellen: Sie kreuzt die durch den Körper des Embryo gebildete Mittellinie des Dottersackes und reicht bis in die rechte Hälfte hinüber.



**Abbildung 15:** *In situ* Hybridisierung gegen Cx40-RNA nach Ligatur der rechten Vitellin-Arterie. 2,5 und 3,5 Tage alte Hühnerembryonen nach 6h (A) und 24h (B) Ligationsdauer. *roter Pfeil:* linke Vitellin-Arterie, *schwarzer Pfeil:* Ligationsstelle.

## B ERFORSCHUNG VON ARTERIELLEN UND VENÖSEN STRÖMUNGSSCHARAKTERISTIKA

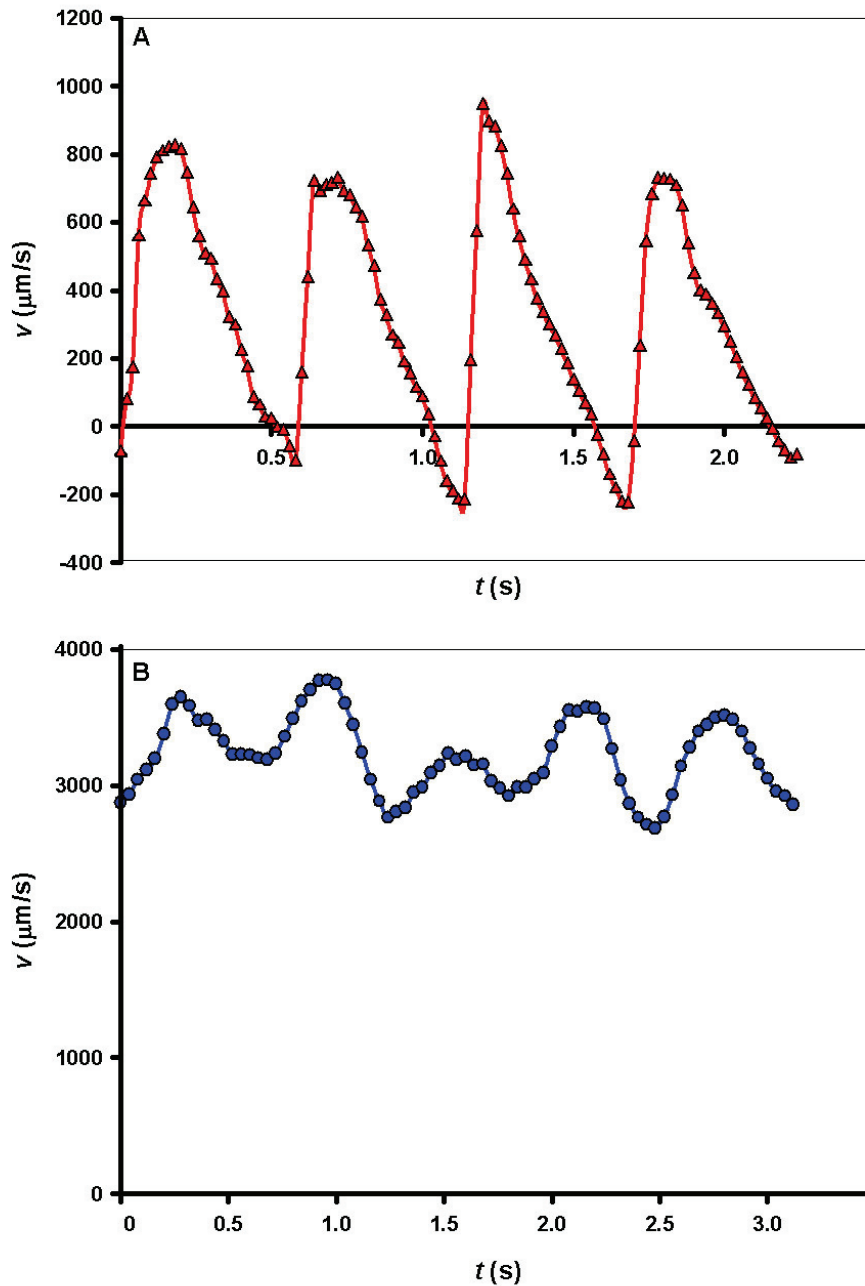
Es wurde die Blutströmung in den Dottersäcken drei Tage alter Hühnerembryonen ( $n = 16$ ) untersucht (Abb. 16). Insgesamt wurden dabei 56 Arterien und 59 Venen mit Durchmessern im Bereich von 20 bis 150  $\mu\text{m}$  (Arterien) bzw. 20 bis 220  $\mu\text{m}$  (Venen) analysiert.



**Abbildung 16:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Dottersackzirkulation eines drei Tage alten Hühnerembryo. a: Arterie, v: Vene.

### 3.3 Strömungsprofile

In Abbildung 17 sind exemplarisch charakteristische Geschwindigkeitsprofile einer Arterie (A) und einer Vene (B) der Dottersackzirkulation dargestellt. Das arterielle Gefäß weist eine stark pulsatile Strömung mit teilweise negativen Geschwindigkeitswerten (Rückfluss) auf. Die Blutströmung in der Vene ist weniger pulsatil und hat eine höhere Geschwindigkeit als in der Arterie.



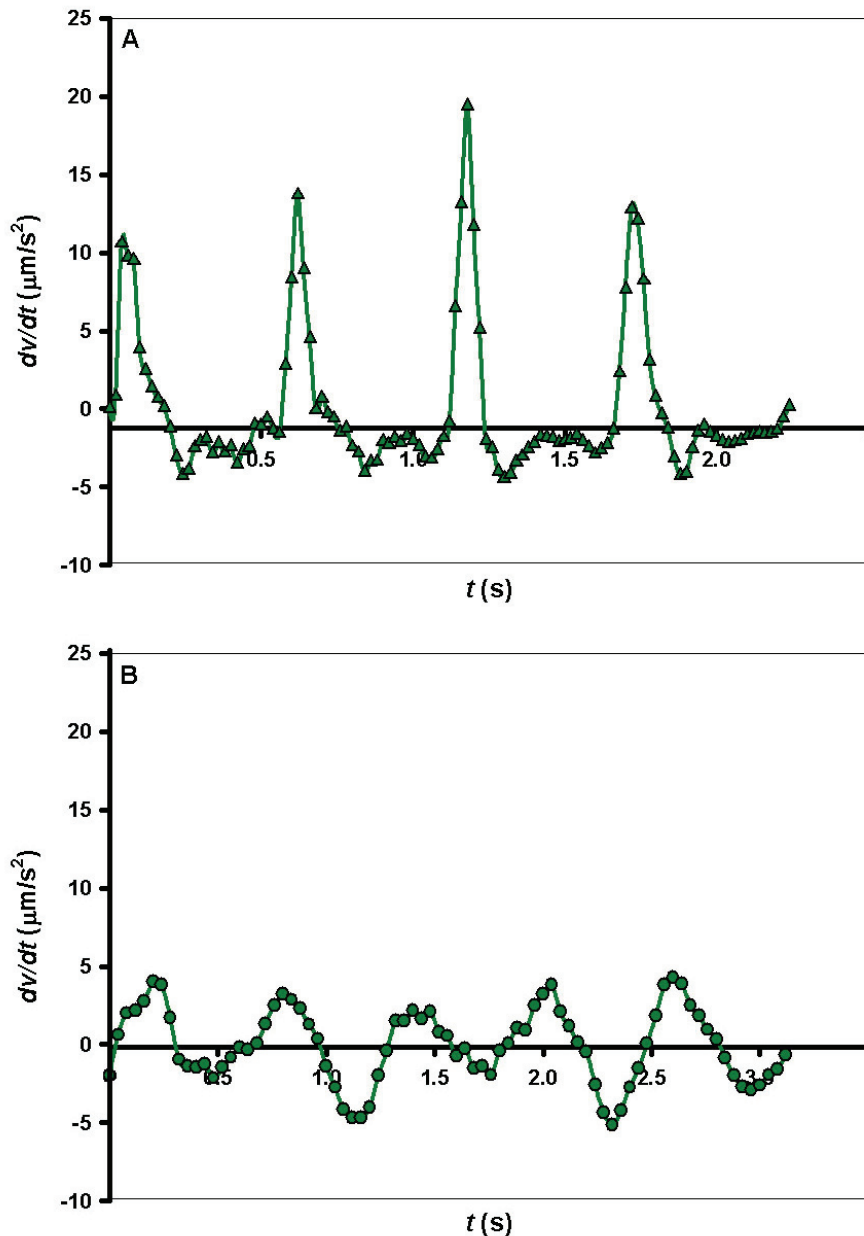
**Abbildung 17:** Charakteristische arterielle und venöse Geschwindigkeitsprofile der Dottersackzirkulation eines drei Tage alten Hühnerembryo. (A) Arterie, (B) Vene.

### 3.4 Berechnete hämodynamische Parameter

Abbildung 18 zeigt exemplarisch die aus den Geschwindigkeitsverläufen errechneten Beschleunigungsverläufe einer Arterie (A) und Vene (B) der Dottersackzirkulation.

Die Arterie weist Beschleunigungsmaxima von bis zu  $20 \mu\text{m/s}^2$  auf, die Vene erreicht maximal 25% dieses Wertes.





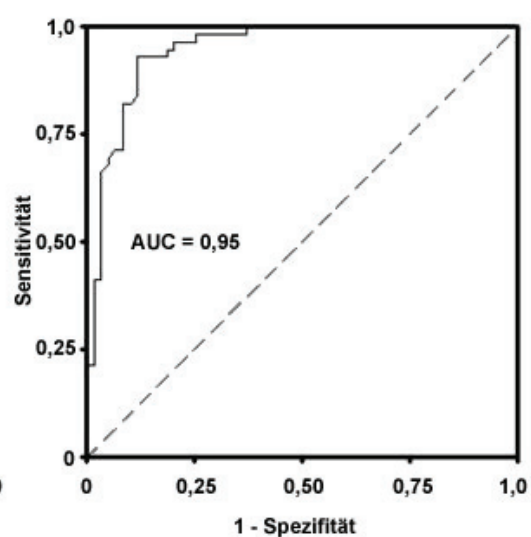
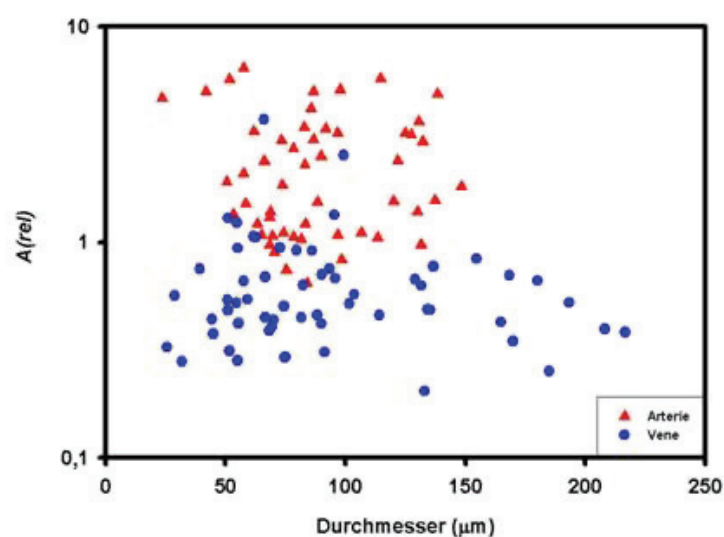
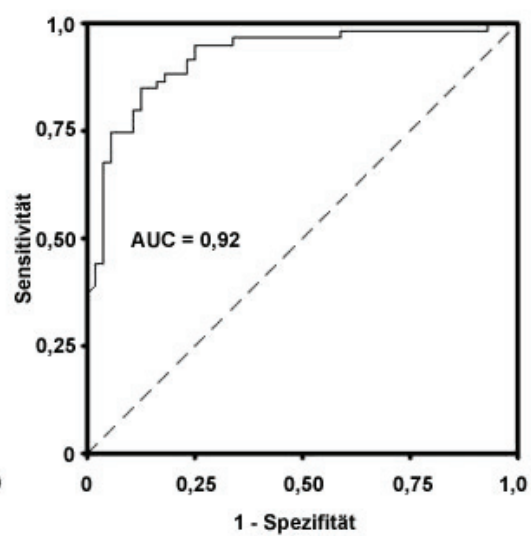
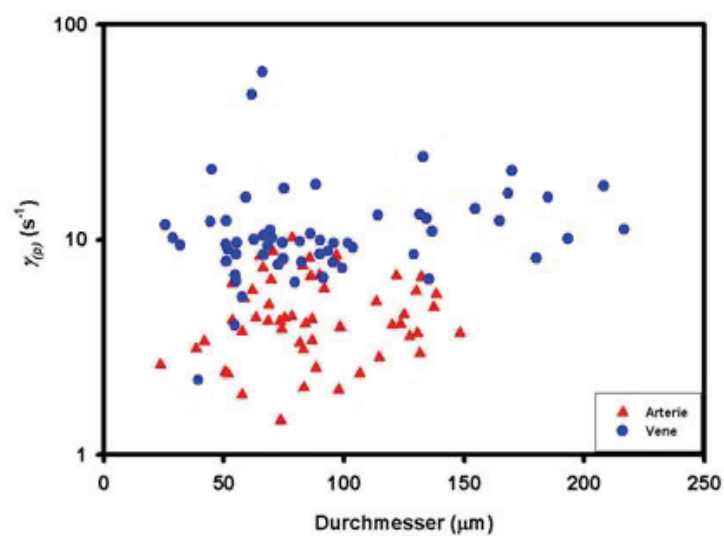
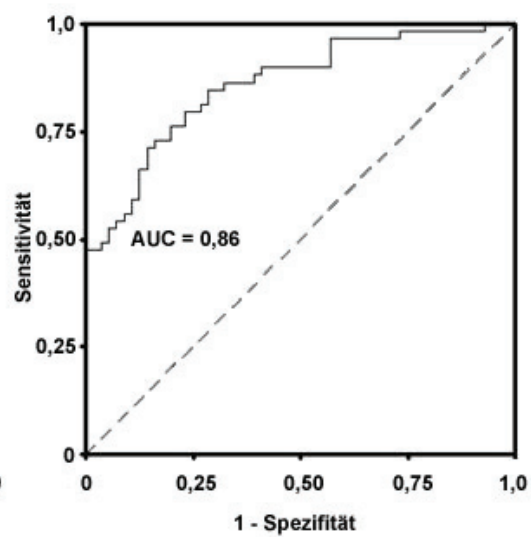
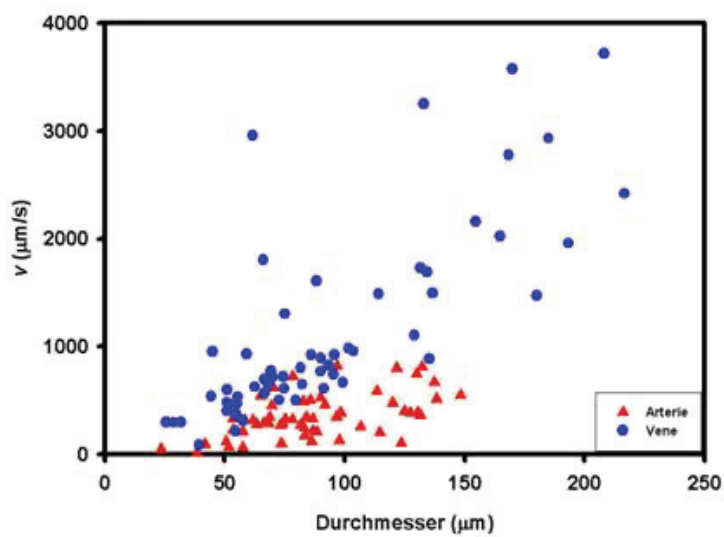
**Abbildung 18:** Charakteristische arterielle und venöse Beschleunigungsprofile der Dottersackzirkulation eines drei Tage alten Hühnerembryo. (A) Arterie, (B) Vene.

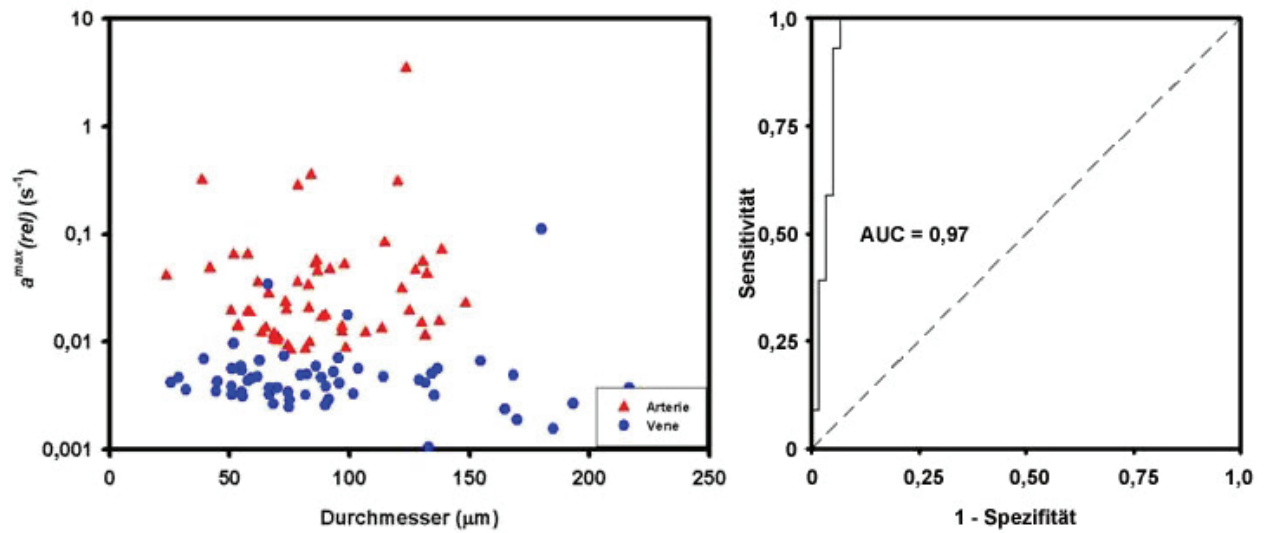
In Abbildung 19 werden axiale Strömungsgeschwindigkeit, mittlere Pseudo-Scherrate, relative Maximalbeschleunigung und relative Amplitude in Arterien und Venen der Dottersackzirkulation verglichen. Die Durchmesser der analysierten Arterien und Venen sind vergleichbar und ein signifikanter Unterschied liegt nicht vor.

Die durchschnittliche axiale Strömungsgeschwindigkeit war in Venen mit  $(1120 \pm 882)$   $\mu\text{m/s}$  rund 3x höher als in Arterien ( $(360 \pm 209)$   $\mu\text{m/s}$ ). Die mittlere Pseudo-Scherrate

wird als Quotient von axialer Strömungsgeschwindigkeit und Durchmesser berechnet. Deswegen war auch diese in den Venen deutlich höher als in Arterien ( $(12,15 \pm 8,94) \text{ s}^{-1}$  vs.  $(4,84 \pm 2,16) \text{ s}^{-1}$ ). Die relative Amplitude und die relative Maximalbeschleunigung hingegen waren in den Arterien durchschnittlich größer: Die relative Amplitude variierte in Arterien zwischen 0,64 und 31,86 mit einem Mittelwert von  $(3,35 \pm 4,71)$  und in Venen zwischen 0,20 und 3,70 (Mittelwert  $(0,67 \pm 0,54)$ ). Die relative Maximalbeschleunigung lag in Arterien bei  $0,01 \text{ s}^{-1}$  bis  $3,43 \text{ s}^{-1}$  (Mittelwert  $(0,11 \pm 0,46) \text{ s}^{-1}$ ) und in Venen bei  $0,001 \text{ s}^{-1}$  bis  $0,11 \text{ s}^{-1}$  (Mittelwert  $(0,007 \pm 0,02) \text{ s}^{-1}$ ).

Die Fläche unter den jeweils rechts dargestellten ROC-Kurven (AUC: area under the curve) ist ein Maß für die Trennschärfe der untersuchten Parameter und liegt zwischen 0,86 (für die axiale Strömungsgeschwindigkeit) und 0,97 (für die relative Maximalbeschleunigung).

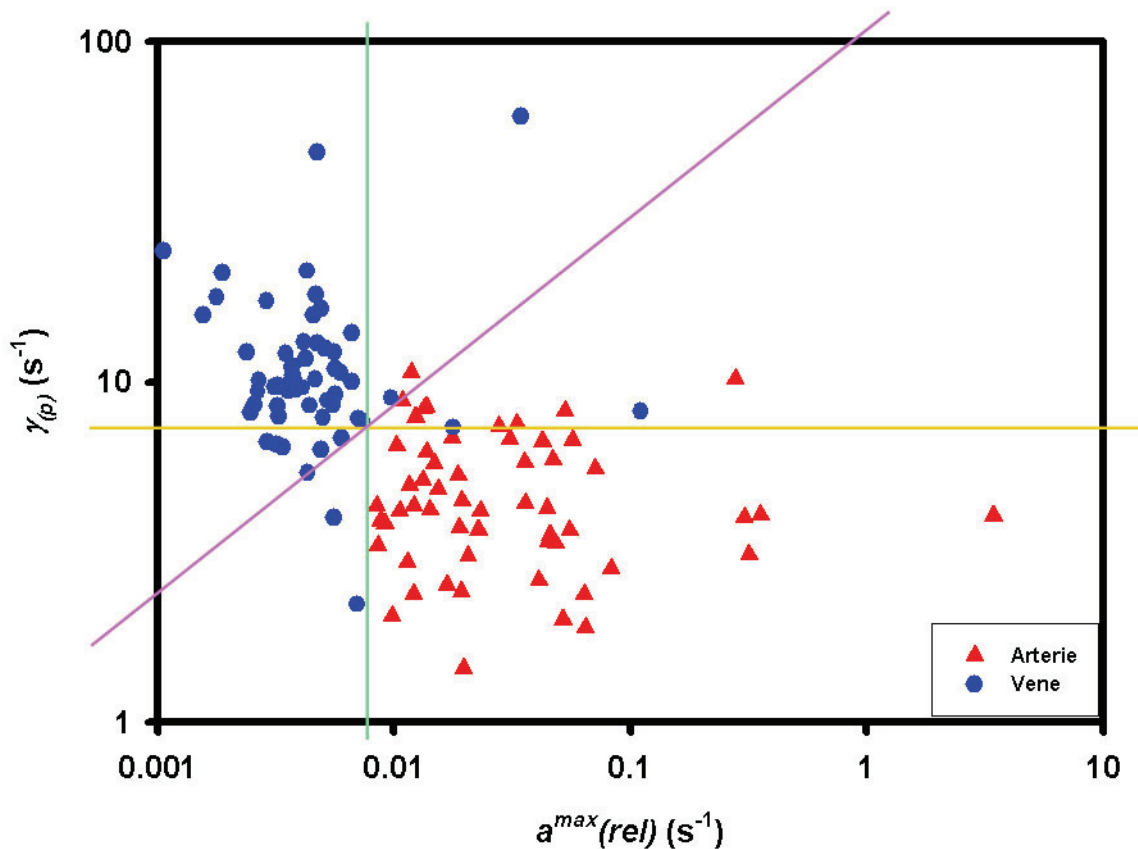




**Abbildung 19:** *Hämodynamische Bedingungen in Arterien und Venen des Dottersackes drei Tage alter Hühnerembryonen.* Darstellung von axialer Strömungsgeschwindigkeit ( $v$ ), mittlerer Pseudo-Scherrate ( $\gamma_{(p)}$ ), relativer Amplitude ( $A(rel)$ ) und relativer Maximalbeschleunigung ( $a^{max}(rel)$ ) gegen Durchmesser (links) mit jeweils zugehörigen ROC-Kurven (rechts). ( $n = 16$ )

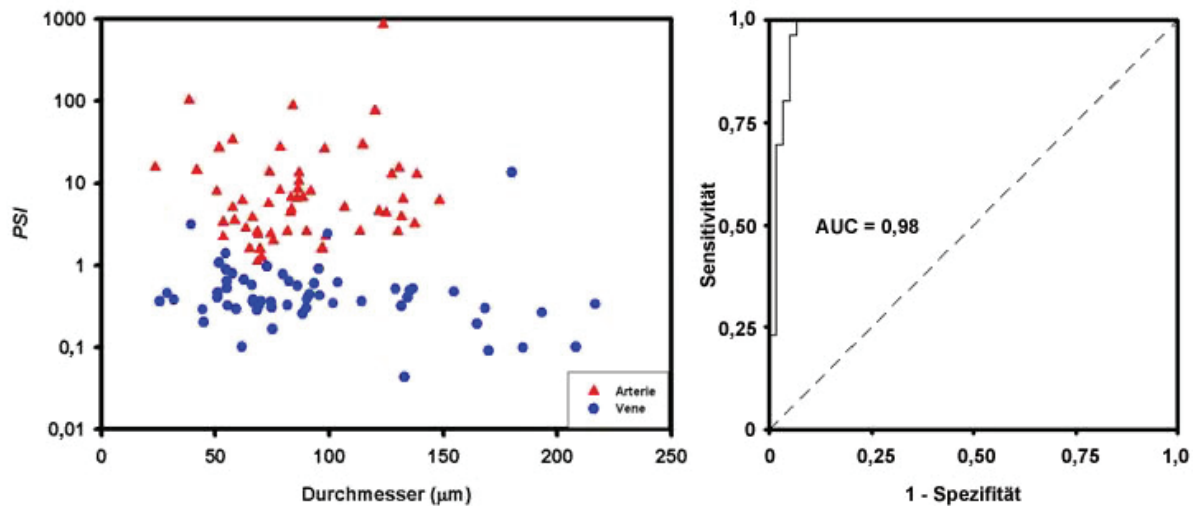
In Abbildung 20 sind mittlere Pseudo-Scherrate und relative Maximalbeschleunigung einander gegenübergestellt.

Es ist deutlich, dass beide Parameter zwar ein gewisses Maß an Separation zwischen Arterien und Venen erlauben, ihre Kombination die Trennschärfe jedoch noch verbessern kann.



**Abbildung 20:** Mittlere Pseudo-Scherrate ( $\gamma_{(p)}$ ) und relative Maximalbeschleunigung ( $a^{max}(rel)$ ) in Arterien und Venen des Dottersackes drei Tage alter Hühnerembryonen. grüne Linie: Separation unter Berücksichtigung der relativen Maximalbeschleunigung, orange Linie: Separation unter Berücksichtigung der mittleren Pseudo-Scherrate, violette Linie: Separation unter Berücksichtigung beider Parameter.

Kombination der in Abbildung 20 dargestellten Parameter in Form eines Quotienten aus relativer Maximalbeschleunigung und mittlerer Pseudo-Scherrate ergibt den Pulse Slope Index (PSI), in Abbildung 21 dargestellt. Dieser erlaubt eine noch bessere Separation zwischen Arterien und Venen (AUC = 0,98).



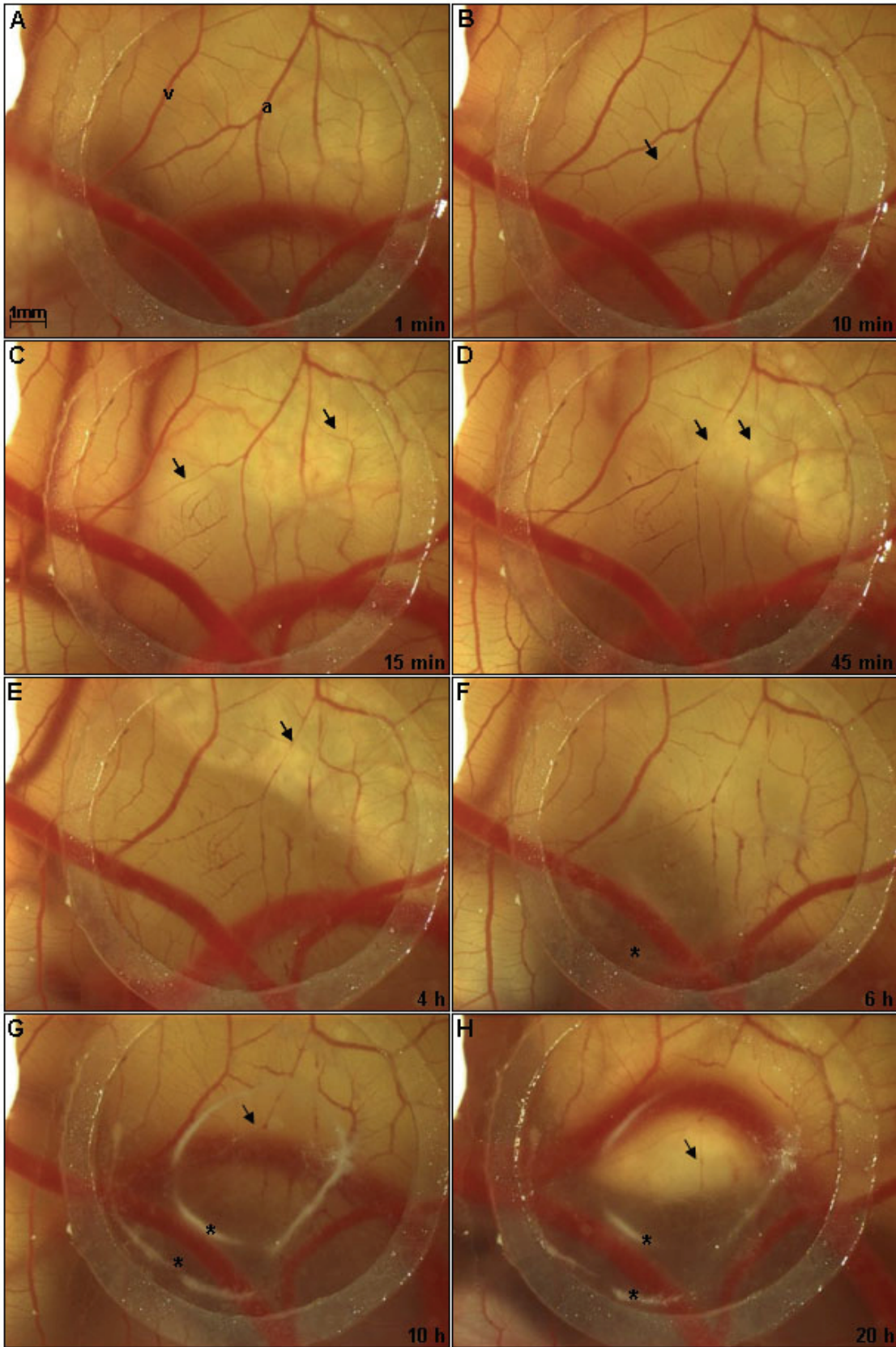
**Abbildung 21:** Pulse Slope Index (PSI) in Arterien und Venen des Dottersackes drei Tage alter Hühnerembryonen. Darstellung des Pulse Slope Index gegen Durchmesser (links) mit zugehöriger ROC-Kurve (rechts). Der PSI berechnet sich als Quotient aus relativer Maximalbeschleunigung und mittlerer Pseudo-Scherrate.

## C FUNKTION VON CONNEXINEN IM GEFÄßSYSTEM

### 3.5 Connexin-Hemmung durch Carbenoxolon

Abbildung 22 zeigt den Effekt des Connexin-Hemmers Carbenoxolon auf die Gefäße der Chorioallantoismembran (CAM) eines zehn Tage alten Hühnerembryo. Zehn Minuten nach der Zugabe von Carbenoxolon sind erste Kontraktionen arterieller CAM-Gefäße zu erkennen. Nach 20 Stunden haben diese Kontraktionen zur Ausbildung einer avaskulären Zone geführt. Venen sind an der Akutreaktion nicht beteiligt und scheinen sich nur geringfügig zu verändern.

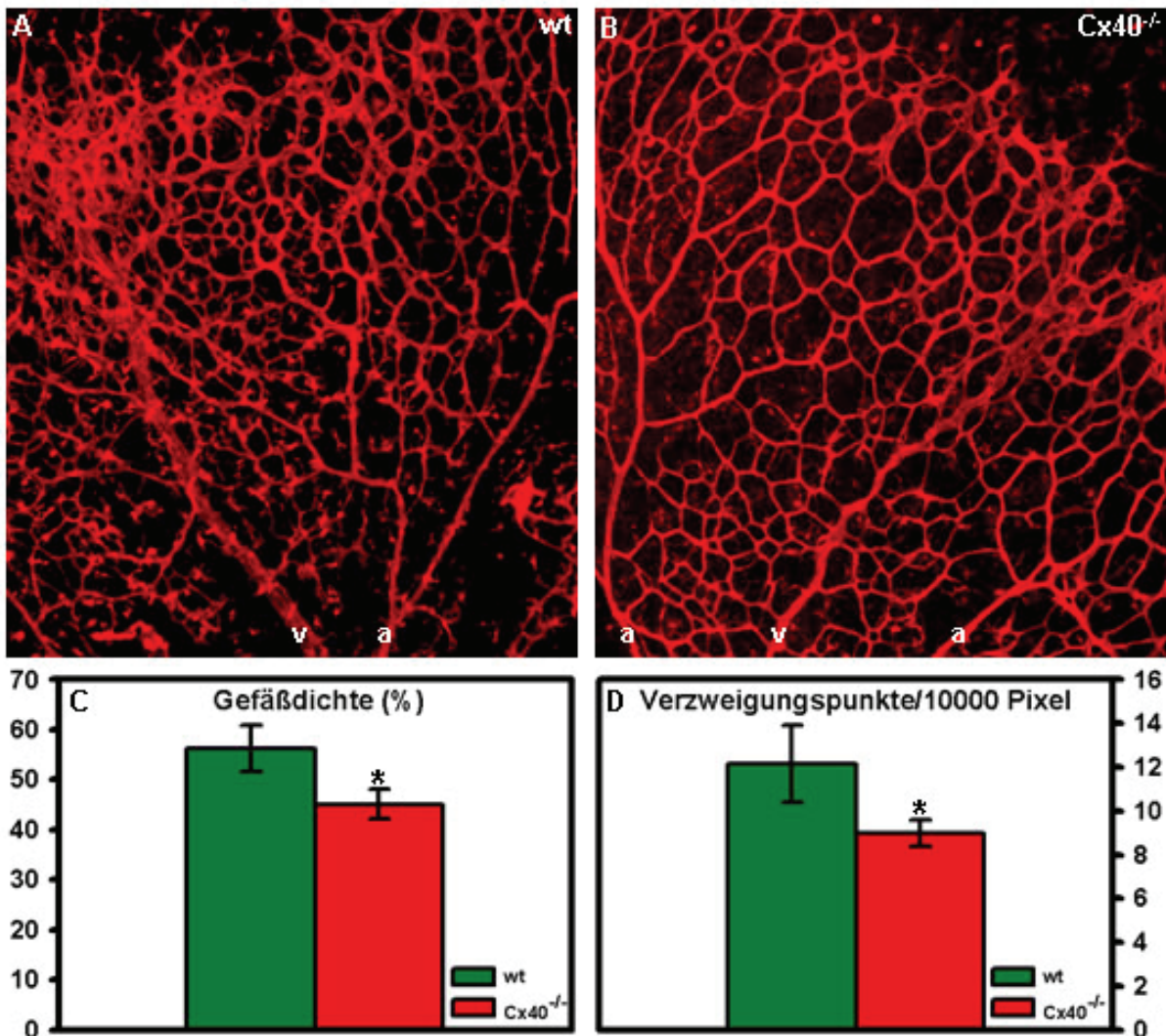
**Abbildung 22:** *Effekt von Carbenoxolon nach Applikation auf die Chorioallantoismembran eines zehn Tage alten Hühnerembryo. Einzelbilder einer Timelapse-Videomikroskopie. a: Arterie, v: Vene, schwarzer Pfeil: kontrahierende Gefäße, schwarzer Stern: Fibrinogenbildung. (n = 5)*





### 3.6 Auswirkung von Cx40-Defizienz

In Abbildung 23 ist ein Vergleich der retinalen Gefäßnetzwerk-Architektur von Wildtyp- und Cx40-defizienten Mäusen (Cx40<sup>-/-</sup>) zu sehen. Isolectin B4-gefärbte Gefäßnetzwerke der Wildtyp-Mäuse weisen eine recht dichte, fein verzweigte Struktur auf. Die Gefäßnetzwerke der Cx40<sup>-/-</sup>-Mäuse wirken im Vergleich dazu ausgedünnt und grobmaschig. Quantifizierungen dieser Unterschiede zeigen eine um 20% verminderte Gefäßdichte und eine um 26% geringere Anzahl von Verzweigungspunkten/10000 Pixel im retinalen Gefäßnetzwerk der Cx40<sup>-/-</sup>-Mäuse. Beide Änderungen sind signifikant.



**Abbildung 23:** Vergleich der retinalen Gefäßnetzwerk-Architektur von Wildtyp- und Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen. (A, B) Isolectin B4-gefärbte Retinagefäße, (C, D) Quantifizierung der Gefäßdichte und der Anzahl der Verzweigungspunkte innerhalb des retinalen Gefäßnetzwerkes. a: Arterie, v: Vene, \*: p < 0,05. (n = 5)