

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kontrolle arteriovenöser Differenzierung durch Sauerstoff und  
Blutströmung: Bedeutung der Expression, Regulation und  
Funktion von Connexinen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Ulm

aus Aschaffenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. R. Pries  
2. PD Dr. med. C. de Wit  
3. PD Dr. med. C. Tschöpe

Datum der Promotion: 03.09.2010

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung des Blutgefäßsystems	2
1.2	Hämodynamik	3
1.3	Arteriovenöse Differenzierung	5
1.4	Gap junctions / Connexine	6
1.5	Aufgabenstellung	7
1.6	Lebensbedingungen des Hühnerembryo im Ei	8
1.6.1	Dottersack	8
1.6.2	Amnion und Chorion	9
1.6.3	Allantois	9
1.6.4	Bildung der Chorioallantoismembran	10
1.6.5	Entwicklung des Kreislaufsystems	11
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1	Herkunft und Bebrütung der Hühnerembryonen	13
<b>A</b>	<b>Expression und Regulation von Connexinen</b>	<b>13</b>
2.2	Synthese der RNA-Sonden	13
2.2.1	Organentnahme und RNA-Isolation	14
2.2.2	Reverse Transkription	14
2.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	15
2.2.4	Ligation von PCR Fragmenten	15
2.2.5	Herstellung von LB-Ampicillin-Platten	16
2.2.6	Transformation von <i>E.coli</i> Zellen	16
2.2.7	Anzucht und Aufbewahrung transformierter <i>E.coli</i> - Stämme	16
2.2.8	Plasmid-Schnellpräparation aus 2 ml-Kulturen	16
2.2.9	Linearisierung des Vektors	17
2.2.10	Reinigung von Nukleinsäuren	17
2.2.11	<i>In vitro</i> Transkription	17
2.3	Präparation der Hühnerembryonen	18
2.4	<i>In situ</i> Protokoll	18
2.5	Ligation	19

2.6	Sauerstoff	19
2.7	Real-time quantitative PCR	19
2.8	Herzfrequenzen	20
<b>B</b>	<b>Erforschung von arteriellen und venösen Strömungscharakteristika</b>	<b>21</b>
2.9	Intravitalmikroskopie	21
2.10	Auswertung der Geschwindigkeiten und Durchmesser	22
2.11	Berechnete hämodynamische Parameter	24
<b>C</b>	<b>Funktion von Connexinen im Gefäßsystem</b>	<b>24</b>
2.12	Connexin-Hemmung durch Carbenoxolon	24
2.13	Auswirkung von Cx40-Defizienz	25
2.13.1	Präparation der Retina	25
2.13.2	Färbeprotokoll	25
2.13.3	Auswertung	26
2.14	Verwendete Lösungen	27
2.15	Verwendete Chemikalien	29
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
<b>A</b>	<b>Expression und Regulation von Connexinen</b>	<b>30</b>
3.1	Vaskuläre Expressionsmuster von Connexin 37, 40 und 43	30
3.2	Regulation der Connexin-Expression	32
3.2.1	Sauerstoff als potentieller Regulator der Connexin-Expression	32
3.2.2	Blutströmung als potentieller Regulator der Connexin-Expression	33
<b>B</b>	<b>Erforschung von arteriellen und venösen Strömungscharakteristika</b>	<b>36</b>
3.3	Strömungsprofile	36
3.4	Berechnete hämodynamische Parameter	37

<b>C</b>	<b>Funktion von Connexinen im Gefäßsystem</b>	<b>44</b>
3.5	Connexin-Hemmung durch Carbenoxolon	44
3.6	Auswirkung von Cx40-Defizienz	46
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>47</b>
<b>A</b>	<b>Expression und Regulation von Connexinen</b>	<b>47</b>
4.1	Regulation der Connexin-Expression	49
4.2	Sauerstoff als potentieller Regulator der Connexin-Expression	49
4.3	Blutströmung als potentieller Regulator der Connexin-Expression	50
<b>B</b>	<b>Erforschung von arteriellen und venösen Strömungscharakteristika</b>	<b>52</b>
<b>C</b>	<b>Funktion von Connexinen im Gefäßsystem</b>	<b>54</b>
4.4	Connexin-Hemmung durch Carbenoxolon	54
4.5	Auswirkung von Cx40-Defizienz	54
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>73</b>

# 1. EINLEITUNG

Das kardiovaskuläre System wird als das erste Organsystem angesehen, das sich während der Embryogenese entwickelt (86, 25, 89). Die Entwicklung aller anderen Organe ist von einer adäquaten Versorgung über das kardiovaskuläre System abhängig, das unter anderem den Antransport von Sauerstoff und Nährstoffen und Abtransport von Kohlendioxid und Stoffwechselendprodukten gewährleistet (43). Außerdem tragen Endothelzellen zur Differenzierung von Organen bei (56, 57).

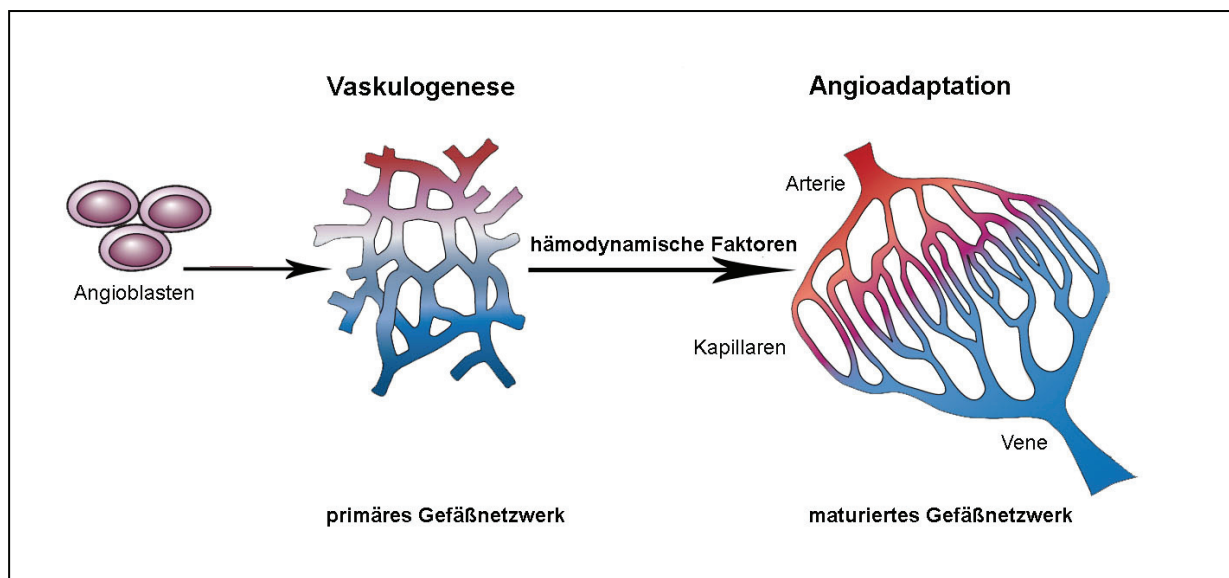
Parallel zur Entwicklung des Herzens entstehen intra- und auch extraembryonal Blutgefäße. Die Entwicklung des Gefäßsystems findet in zwei Schritten statt: Vaskulogenese und Angioadaptation. Während der Vaskulogenese schließen sich endotheliale Vorläuferzellen zusammen und bilden ein primitives Gefäßnetzwerk, welches bei Beginn der embryonalen Herzaktion die initiale Blutzirkulation ermöglicht (25). Dieses primäre Netzwerk wird durch Angioadaptation zu einem hierarchischen Gefäßbaum aus Arterien, Venen und Kapillaren umgeformt.

Die Ausbildung des Gefäßbaumes ist Resultat eines komplexen Wechselspiels zwischen genetischen Faktoren und epigenetischen Faktoren wie Hämodynamik und Oxygenierung. Der Prozess der Vaskulogenese wird als genetisch kontrolliert angesehen, da in diesem Entwicklungsstadium noch keine Blutströmung vorliegt und metabolische Faktoren eine untergeordnete Rolle spielen (45). Im Prozess der Angioadaptation eröffnet sich zusätzlich zu genetischen Regulationsmechanismen durch den Beginn der embryonalen Herzaktion die Möglichkeit einer funktionellen Rückkopplung über hämodynamische Faktoren. Diese sind neben intravaskulären Kommunikationsprozessen für eine adäquate Ausbildung eines hierarchisch strukturierten Gefäßnetzwerkes von großer Bedeutung (79, 80, 81). Essentiell für angioadaptive Prozesse ist außerdem eine normale Entwicklung arteriovenöser Identität. Die Differenzierung von Gefäßen in Arterien und Venen wurde anfänglich ausschließlich für ein Resultat hämodynamischer Kräfte gehalten (102). Diese Theorie wurde in Frage gestellt, da Angioblasten schon vor der Ausbildung primärer Gefäßnetzwerke und dem Beginn der Blutströmung arteriell und venös spezifische Gene exprimieren (106).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung arteriovenöser Differenzierung und ihrer Beeinflussung durch epigenetische Faktoren (Sauerstoff, Hämodynamik) in der Embryonalentwicklung. Hierzu wurde die vaskuläre Expression und Regulation der Connexine 37, 40 und 43 untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt der Arbeit lag dabei in der detaillierten Analyse hämodynamischer Differenzen embryonaler Arterien und Venen *in vivo*. Außerdem wurden Anhaltspunkte über die Bedeutung der Connexine für angioadaptive Prozesse gewonnen.

## 1.1 Entwicklung des Blutgefäßsystems

Die embryonale Entwicklung des Gefäßsystems lässt sich in zwei Phasen einteilen (Abb. 1). Während der ersten Phase, der **Vaskulogenese**, differenzieren mesodermale Zellen zu endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten), die ein primäres Gefäßnetz bilden (90). Dieser primäre Plexus weist anfänglich ein isotropes Verzweigungsmuster und morphologisch relativ uniforme Gefäße auf (86). Durch den Beginn der embryonalen Blutzirkulation wird die zweite Phase der Gefäßentwicklung eingeleitet. Durch **Angioadaptation** wird nun die Isotropie des primären Plexus durch ein hierarchisches System von Arterien, Venen und Kapillaren ersetzt (85).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Entwicklung eines Gefäßnetzwerkes (modifiziert nach (7)).

Der Prozess der Angioadaptation beinhaltet verschiedene Mechanismen: Angiogenese, Remodelling und Pruning. Die Ausbildung zusätzlicher Gefäße wird **Angiogenese** genannt. Es wird zwischen Angiogenese durch Sprossung (*sprouting angiogenesis*) und durch Gefäßteilung („Intussuszeption“, *non-sprouting angiogenesis*) unterschieden (6, 85). **Remodelling**, die strukturelle Veränderung existierender Gefäßsegmente, beinhaltet unter anderem Veränderungen in Gefäßdurchmesser oder Wanddicke (85). Als **Pruning** wird die Elimination redundanter Gefäßsegmente bezeichnet (85).

In Hühner- und Säugetierembryonen beginnt die vaskuläre Entwicklung mit der Ausbildung eines homogenen primären Plexus, der nach Beginn der Blutzirkulation stark remodelliert wird (88, 90). Auch in der embryonalen Gefäßentwicklung in Dottersack, Chorion-Allantois-Membran (CAM) oder Retina sind angioadaptive Prozesse zu beobachten (61, 21). In Modellorganismen wie *Xenopus laevis* und Zebrafisch scheinen Angioadaptationsprozesse für die Ausbildung hierarchischer Gefäßnetzwerke von geringerer Bedeutung zu sein (11, 31, 107).

Mit Beginn der Blutzirkulation wirken viele unterschiedliche Faktoren auf die Gefäße ein. Die Blutströmung transportiert Nährstoffe, Sauerstoff und Signalmoleküle zu den Gefäßen und übt außerdem biomechanische Kräfte auf die Endothelzellen der Gefäßwand aus. Der Transport von Sauerstoff durch das Blut scheint kurz nach Beginn der embryonalen Herzaktion für eine Angioadaptation von geringer Bedeutung zu sein, was durch Kultivierung von Zebrafisch- (77) oder Hühnerembryonen (10) in Kohlenmonoxid gezeigt werden konnte. Hämodynamische Faktoren hingegen haben deutliche Auswirkungen auf angioadaptive Prozesse während der Embryonalentwicklung (67).

## **1.2 Hämodynamik**

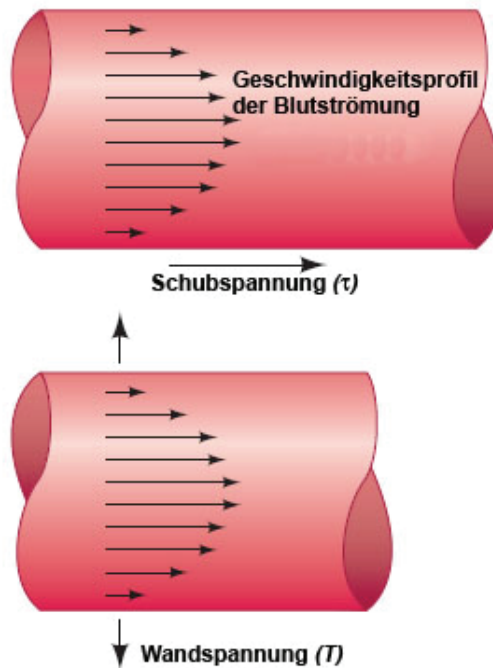
Die Bedeutung von Hämodynamik für die Gefäßentwicklung wird deutlich dadurch demonstriert, dass Entfernung der Herzen von Hühnerembryonen vor Beginn der Blutzirkulation die Ausbildung eines primären Gefäßnetzwerkes ohne anschließende Angioadaptation zur Folge hat (9). In der *Ncx1* knock-out Maus sind vergleichbare Effekte zu sehen. In dieser Maus bildet sich kein funktionelles Herz aus. Die Embryonen bilden ein primäres Gefäßnetz im Dottersack, das nicht remodelliert wird (105). Welche



der durch die Blutzirkulation entstehenden Kräfte für angioadaptive Prozesse von Bedeutung sind, ist nicht bekannt.

Mit Beginn der Blutzirkulation sind Blutgefäße permanent biomechanischen Kräften ausgesetzt (Abb. 2) (62, 83). Strömendes Blut übt eine Reibungskraft auf die Endotheloberfläche aus. Diese entlang der Gefäßoberfläche wirkende Kraft wird als **Schubspannung** ( $\tau$ ) bezeichnet und ist als das Produkt von apparenter Viskosität ( $\mu_{app}$ ) und Scherrate  $\gamma$  definiert:  $\tau = \mu_{app} \gamma$ . Der Blutdruck übt eine senkrecht zur Gefäßoberfläche wirkende Kraft aus und führt zu einer Dehnung des Gefäßes. Die daraus resultierende **Wandspannung** ( $T$ ) beschreibt das Gesetz von Laplace als  $T = P r / h$  ( $P$ : Blutdruck,  $r$ : Gefäßradius,  $h$ : Wanddicke).

Modulation der Schubspannung *in vitro* kann Veränderungen in der Morphologie, der Proteinsynthese und der Genexpression von Endothelzellen hervorrufen (4, 19, 20, 68). Neben der Expositionsdauer und der Intensität der applizierten Schubspannung spielen auch experimentelle Bedingungen (gleichmäßige oder oszillatorische Strömungsprofile, laminare oder turbulente Strömung) eine Rolle für resultierende biologische Effekte (5, 32). Auch Wandspannung kann genetische Signalwege aktivieren (62).



**Abbildung 2:** Biomechanische Kräfte in Blutgefäßen (modifiziert nach (45)).

Strömendes Blut übt eine Kraft entlang der Gefäßoberfläche aus (Schubspannung  $\tau$ ). Der Blutdruck übt eine senkrecht zur Gefäßoberfläche wirkende Kraft aus und führt zu einer Dehnung des Gefäßes. Diese resultiert in der Wandspannung ( $T$ ), welche durch das Gesetz von Laplace beschrieben wird.

### 1.3 Arteriovenöse Differenzierung

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Differenzierung der primären Gefäße zu Arterien und Venen ausschließlich durch hämodynamische Kräfte reguliert wird (102). Aktuelle Studien hingegen zeigen, dass die arteriovenöse Identität von Gefäßen auch genetisch determiniert ist: In den letzten Jahren wurden arterielle und venöse „Marker“ identifiziert, die von Endothelzellen schon vor ihrer Zusammenlagerung zum primären Gefäßnetz und dem Beginn der Blutströmung spezifisch exprimiert werden.

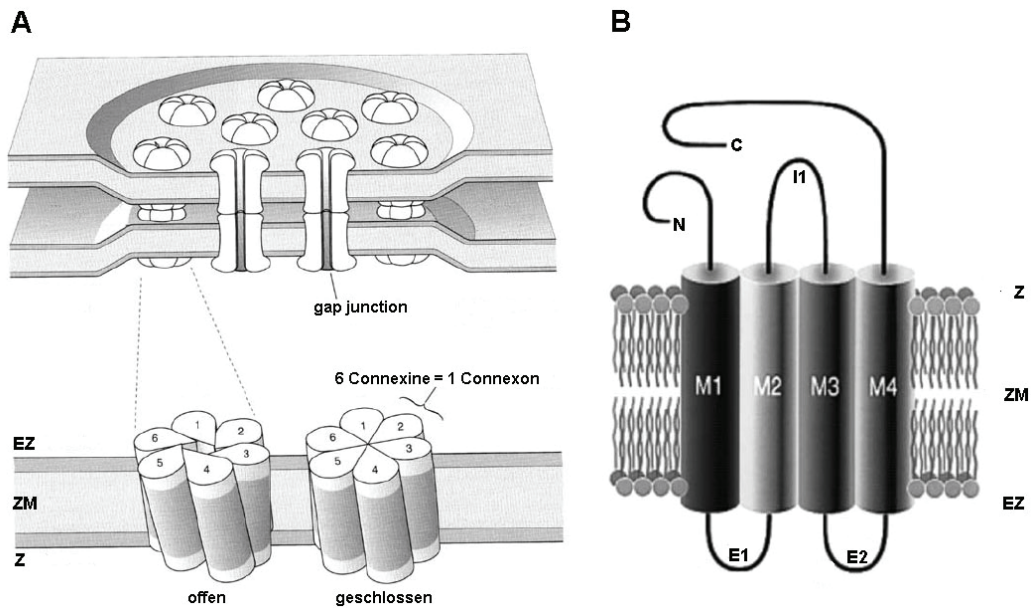
Zu den arteriellen Markern zählen CD44 (108), Delta-like 4 (94), ephrinB2 (1, 59, 106), gridlock (111), Neuropilin-1 (40, 41, 70, 71), notch 4 (104) und Unc5b (66). COUP-TFII (109), EphB4 (1, 59, 106, 39), Neuropilin-2 (110, 40, 41) und Tie2 (70) sind als venöse Marker etabliert. Diese Gene scheinen eine essentielle Funktion für das Gefäßwachstum und die Entwicklung einer Gefäßidentität auszuüben.

Auch Connexin 37 und 40 wurden als arterielle Marker beschrieben (93, 71). Sie sind an der Ausbildung von gap junctions zwischen Zellen beteiligt und spielen eine wichtige Rolle für intravaskuläre Kommunikationsprozesse.

#### **1.4 Gap junctions / Connexine**

Es gibt verschiedene Zell-Zell-Kontakte wie tight junctions oder Desmosomen, die Zellen vor allem strukturell miteinander verbinden. Gap junctions sind transmembranäre Kanäle, die eine funktionelle Verbindung benachbarter Zellen ermöglichen. Sie sind aus Connexinen (Cx), viermal transmembranären Proteinen mit einer intra- und zwei extrazellulären Regionen, aufgebaut (Abb. 3). Sechs Connexine oligomerisieren zu einem Halb-Kanal (Connexon) in der Plasmamembran. Dieser kann aus einem Typ von Connexinen (homomer) oder verschiedenen Typen (heteromer) zusammengesetzt sein. Durch Verbindung mit einem anderen Connexon einer anliegenden Zelle entsteht eine interzelluläre Verbindung, die aus identischen oder unterschiedlichen Connexonen (homotypisch/heterotypisch) aufgebaut sein kann und durch die interzelluläre Diffusion von Molekülen mit maximal 1 kDa Molekulargewicht (wie z. B. cAMP oder  $\text{Ca}^{2+}$ ) möglich ist. Auf diese Weise kann Signalübermittlung zwischen Zellen stattfinden und so eine große Anzahl von Zellen zu einer funktionellen Einheit verbunden werden, was für eine koordinierte Aktivität von Organen von zentraler Bedeutung ist.

Derzeit sind 20 (murine) bzw. 21 (humane) verschiedene Cx-Gene bekannt (98), die gewebespezifisch exprimiert werden, davon vier (Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45) im kardiovaskulären System. In Endothelzellen werden überwiegend Cx37 und 40 exprimiert. Cx43 und 45 hingegen kommen vor allem in glatten Muskelzellen vor (14). Über die Expression und spezifische Funktion dieser Connexine in der embryonalen Gefäßentwicklung ist bisher wenig bekannt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Struktur von gap junctions und Connexinen (modifiziert nach (98)).

(A) Struktur einer gap junction. Einander gegenüberliegende Zellen bilden jeweils Connexone, die aus 6 Connexinen aufgebaut sind. Durch Zusammenlagerung zweier Connexone entsteht eine gap junction. Durch Verschiebung einzelner Connexine relativ zueinander wird die Öffnung des Connexons moduliert.

(B) Modell eines Connexins. Die Zylinder (M1-M4) repräsentieren transmembranäre Domänen. E1, E2: extrazelluläre Regionen, I1: intrazelluläre Region. EZ: Extrazellularraum, ZM: Zellmembran, Z: Zytoplasma.

## 1.5 Aufgabenstellung

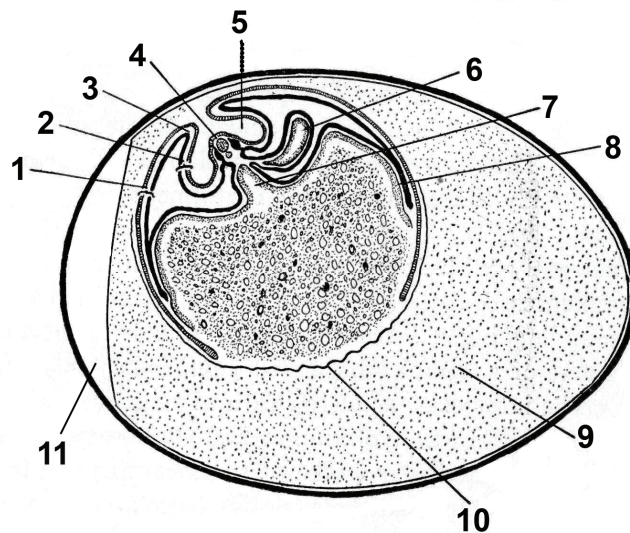
Es wurden folgende Fragen untersucht:

- Ist das Expressionsmuster der vaskulär exprimierten Connexine 37, 40 und 43 in der Embryonalentwicklung arteriell-spezifisch?
- Wird die Expression von Cx40 durch die epigenetischen Faktoren Sauerstoff und Hämodynamik reguliert?
- Was sind die hämodynamischen Unterschiede zwischen embryonalen Arterien und Venen *in vivo*?
- Was ist der vaskuläre Effekt einer Connexin-Inaktivierung?

Als Versuchsmodelle wurden Hühnerembryonen und die Gefäßplexus der sie umgebenden extraembryonalen Membranen ( Dottersack, Chorioallantois-Membran) gewählt. Auch wurden retinale Gefäßnetze neonataler Mäuse untersucht.

### 1.6 Lebensbedingungen des Hühnerembryo im Ei

Der Vogelembryo entwickelt sich in einem kalkschaligen Ei. Im Inneren des Eies ist der Embryo von vier embryonalen Hüllen umgeben, welche während der Embryonalentwicklung lebenswichtige Funktionen erfüllen: Dottersack, Amnion, Chorion und Allantois (Abb. 4) (76).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der extraembryonalen Membranen im Hühnerei am 3. Bebrütungstag (modifiziert nach (76)). Die Abbildung zeigt einen longitudinalen Schnitt durch das Hühnerei.

1: Chorion, 2: Amnion, 3: laterale Amnionabfaltung, 4: Embryo, 5: Amnionhöhle, 6: Allantois, 7: Dottersackstiel, 8: Dottersackwand, 9: Eiweiß, 10: Vitellin-Membran, 11: Luftraum.

#### 1.6.1 Dottersack

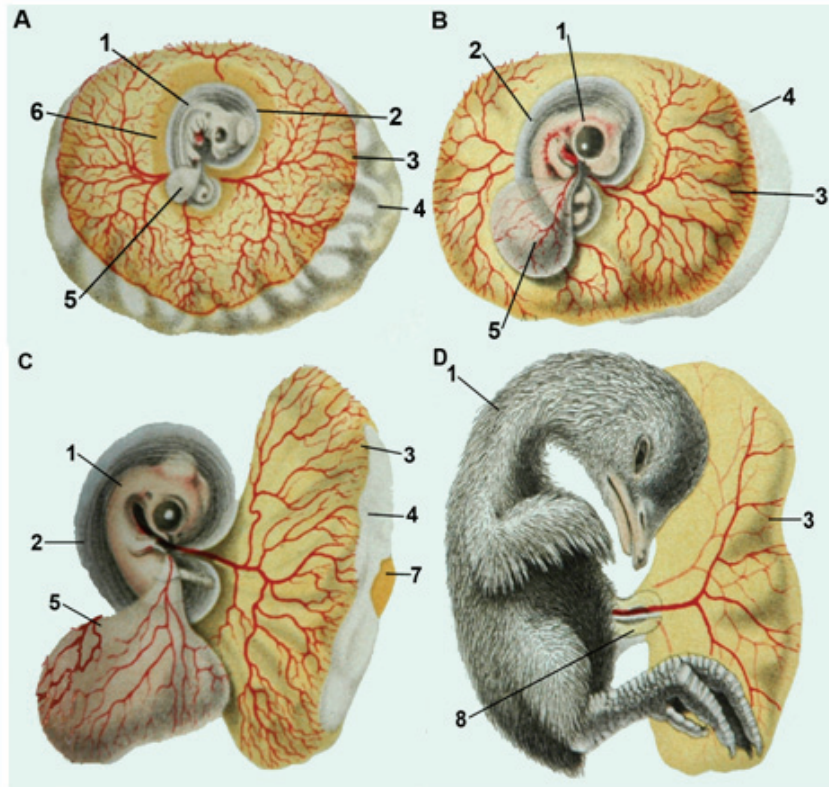
Der Dottersack wird primär von einer Dottersackwand umfasst (76). Zusätzlich wird der Dotter von einer „Dottersackhaut“, der Vitellin-Membran, umschlossen. Der Dotter dient der Versorgung des Embryos mit Nähr- und Baustoffen. Diese Stoffe werden über Gefäße in der Dottersackwand (Abb. 5) und anschließend über die im Dottersackstiel verlaufenden Dottersackarterien und Venen (Arteriae und Venae vitellinae) in den beziehungsweise aus dem Embryo transportiert.

### **1.6.2 Amnion und Chorion**

Es bilden sich laterale Amnionfalten, welche die Embryonalanlage umfassen und in der dorsalen Mittellinie unter Bildung der Amnionnaht verschmelzen. Die Amnionnaht verschwindet rasch wieder, so dass sich die beiden Lamellen der Amnionfalten unter Bildung des Amnion und des Chorion völlig trennen. Das Amnion umschließt den Embryo (Abb. 5), während das Chorion das extraembryonale Cölom nach außen abschließt. Die um den Embryo gebildete Amnionhöhle ist mit Amnionflüssigkeit gefüllt, was dem Embryo ermöglicht, seine Form, Größe und Lage zu verändern, ohne dass Veränderungen der externen Druckverhältnisse ihn belasten können (76). Am Ende der ersten Inkubationswoche hat der größte Teil des Chorions Kontakt mit der Schalenhaut (50).

### **1.6.3 Allantois**

In der Gegend des Nabels bildet sich nach 48 Stunden eine sackförmige Ausstülpung des Enddarmes, die Allantois (Abb. 5), die unter anderem die Ausscheidungen der embryonalen Nieren aufnimmt. Diese wächst rasch in das extraembryonale Cölom vor und erreicht zwischen dem vierten und fünften Bebrütungstag das Chorion.



**Abbildung 5:** Darstellung embryonaler Hüllen des Hühnerembryos in verschiedenen Stadien vom 4,5. bis zum 19. Tag (modifiziert nach (24)).  
 (A) Tag 4,5, (B) Tag 6, (C) Tag 7, (D) Tag 19 (Amnion und Allantois sind entfernt). 1: Embryo, 2: Amnionhöhle, 3: Area vasculosa, 4: Area vitellina, 5: Allantois, 6: Area pellucida, 7: Dottersacknabel, 8: Darmschlinge.

#### 1.6.4 Bildung der Chorioallantoismembran (CAM)

Die CAM entsteht zwischen dem vierten und fünften Bebrütungstag (18) durch Verschmelzung von Chorion und Allantois. Dabei nimmt der Allantoissack stark an Volumen zu und die einander zugewandten Oberflächen von Chorion und Allantois verschmelzen (84). Nach 12 Bebrütungstagen bedeckt die CAM die innere Eischalenmembran vollständig (69). In dieser Doppelschicht entsteht ein sehr dichtes und verzweigtes Kapillarnetzwerk, welches über die Arterien und Venen der Allantois (Aa. und Vv. umbilicales) mit dem embryonalen Kreislauf verbunden ist (76). Die CAM dient dem Hühnerembryo vor allem als Gasaustauschfläche (69), ähnlich der Plazenta bei Säugetieren, ist aber auch für den Kalziumtransport (23) von der Schale in den Embryo verantwortlich.

## **1.6.5 Entwicklung des Kreislaufsystems**

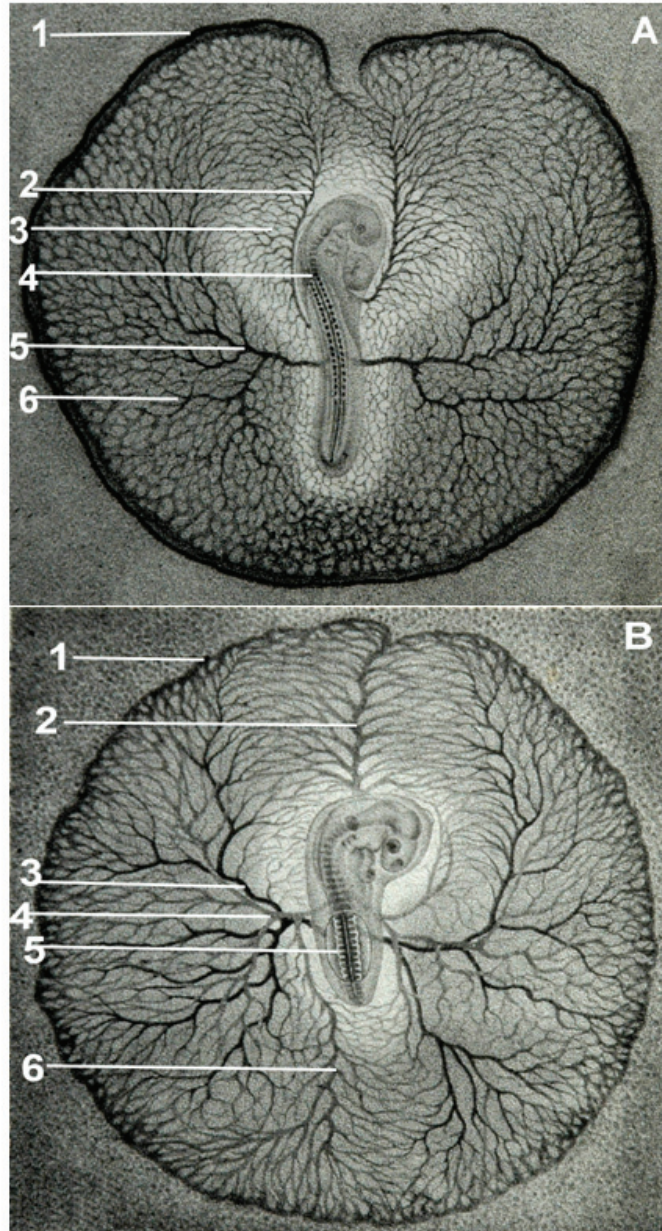
### **Primärer Blutkreislauf**

Der primäre Kreislauf des Hühnerembryos setzt nach ca. 36 bis 48 Stunden Bebrütung durch den Beginn der Herzaktion ein. Das primäre Kreislaufsystem setzt sich aus den Gefäßen im Embryo selbst und den Dottersackgefäßen zusammen (88). Letztere sind in die Dottersackwand eingefasst, deren gefäßreiche Area vasculosa durch eine große ringförmige Vene, den Sinus terminalis, von der nicht vaskularisierten Area vitellina in der Peripherie des Dottersackes abgegrenzt wird (Abb. 5, Abb. 6) (64). Das Blut gelangt durch die Kontraktionen des embryonalen Herzschlauches über die dorsale Aorta und die rechte und linke Arteria vitellina in das arterielle Gefäßbett der Area vasculosa und von dort in den Sinus terminalis. Dieser führt das Blut über die Venen der Area vasculosa und die sich anschließenden Venae vitellinae zurück zum Herzen. Die extraembryonalen Gefäße liegen in diesem primären Kreislauf in einer Ebene (64).

### **Sekundärer Blutkreislauf**

Schon ab dem dritten Bebrütungstag durchlaufen die Gefäße des primären Kreislaufes verschiedene Transformationen, so dass sich am Ende des fünften Bebrütungstages ein dichtes Netzwerk aus Blutgefäßen gebildet hat, die ein Kapillarnetz bilden. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung liegen die Dottersackgefäße in zwei Ebenen vor, wobei die Arteriae vitellinae tief in den Dottersack eingebettet sind und sich die Venae vitellinae an der Oberfläche befinden (Abb. 6).





**Abbildung 6:** Darstellung der primären (A) und sekundären (B) Dottersackzirkulation (modifiziert nach (24)).

(A) 1: Sinus terminalis, 2: Vena vitellina anterior sinistra, 3: Area pellucida, 4: Amnion, Kopf des Embryo bedeckend, 5: Arteria vitellina sinistra, 6: Area vasculosa.

(B) 1: Sinus terminalis, 2: Vena vitellina anterior (durch Fusion beider Venae vitellinae anteriores entstanden), 3: Arteria vitellina sinistra, 4: Vena vitellina sinistra, 5: Embryo mit Amnionhülle, 6: Vena vitellina posterior sinistra (dextra meist kaum ausgebildet).

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Herkunft und Bebrütung der Hühnerembryonen

SPF-Valo-Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ wurden über die Firma Lohmann Tierzucht GmbH bezogen. Die Bebrütung der Eier erfolgte in Inkubatoren der Firma RS Biotech. Die Temperatur betrug durchgängig 37 °C und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Inkubatoren lag bei ca. 80%. Um normoxische Inkubationsbedingungen zu schaffen, wurden die Eier in einem Gemisch aus 21% O<sub>2</sub> und 79% Stickstoff bebrütet. Um einen verminderten oder erhöhten Sauerstoffgehalt zu erreichen, wurden in den Brutschrank über das Kontrollsystem des Inkubators 15% bzw. 70% O<sub>2</sub> in einem Gemisch mit Stickstoff eingeleitet.

### A EXPRESSION UND REGULATION VON CONNEXINEN

Der Nachweis der Expression von Genen auf Transkriptionsebene wurde durch *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden an ganzen Embryonen (whole mount) durchgeführt.

### 2.2 Synthese der RNA-Sonden

Die folgende Tabelle (Tab. 1) informiert über die verwendeten Sonden, deren Herkunft, mit welcher Restriktionsendonuklease die betreffenden Plasmide linearisiert wurden und welche RNA-Polymerase jeweils zur RNA-Synthese in „antisense“-Richtung eingesetzt wurde:

Sonde	Genbank Accession #	Herkunft	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase
Cx37	NM_206984	bp 925-1507 in pGEM-T Easy Vektor	Sal I	T7
Cx40	NM_205504	bp 943- 1522 in pCRII Vektor, erhalten von Herrn Dr. Hurtado	BamH I	T7
Cx43	NM_204568	bp 844- 1261 in pGEM-T Easy Vektor	Sal I	T7

**Tabelle 1:** Verwendete Sonden, ihre Herkunft, Restriktionsenzyme und verwendete RNA-Polymerase zur Synthese der antisense-Sonde.

### 2.2.1 Organentnahme und RNA-Isolation

Elf Tage alten Hühnerembryonen ( $n = 2$ ) wurden Gehirn, Herz und Flügel entnommen und unmittelbar danach in einem 2 ml-Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff gefroren. Die RNA-Isolation wurde den Angaben des Herstellers (Invitrogen) entsprechend mit 1 ml Trizol durchgeführt. Anschließend wurde ihre Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm im Photometer gemessen. Die Qualität und Quantität der gewonnenen RNA wurde durch Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

### 2.2.2 Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription

Die Synthese von cDNA wurde mit dem SuperscriptIII Reverse Transkriptase-Kit von Invitrogen durchgeführt. In einem 0,5 ml-Eppendorfgefäß wurden 2,5 µg RNA in 8 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, mit 1 µl 50 µM oligo(dT) Primern und 1 µl 10 mM dNTP Mix gemischt, 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gebracht (> 1 min).

Nach Zugabe des RT-Mixes (s. u.) wurde der Ansatz 50 Minuten bei 50 °C inkubiert und danach 5 Minuten auf 85 °C erhitzt. Nun wurde 1 µl RNase H dazugegeben und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die auf diese Weise synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### RT-Mix

10X RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
SuperScriptIII RT (200 U/µl)	1 µl

### **2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Gen-spezifische Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. In einem 0,3 ml PCR-Gefäß wurden dafür gemischt:

- 1-4 µl cDNA
- 1 µl FW Primer (10 pmol)
- 1 µl REV Primer (10 pmol)
- 1 µl dNTP Mix (10 mM je dNTP)
- 5 µl 10X PCR Puffer (Roche)
- 1 µl Taq DNA Polymerase (Roche)
- ddH<sub>2</sub>O bis 40 µl

Die Amplifikation wurde in einem Eppendorf RealPlex PCR Gerät folgendermaßen ausgeführt:

Denaturierung: 2 min bei 94 °C

Amplifikation (40 Zykli) : 15 s bei 94 °C, 30 s bei 55 °C, 45 s bei 72 °C

Nach 40 Zykli wurde das Reaktionsgemisch 7 Minuten bei 72 °C inkubiert und anschließend gekühlt aufbewahrt. Die Spezifität der amplifizierten Produkte wurde mittels enzymatischer Digestion einer internen Restriktionsstelle und anschließender Analyse der Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert.

### **2.2.4 Ligation von PCR Fragmenten**

Die PCR-Fragmente wurden auf DNA-bindenden Säulen den Angaben des Herstellers entsprechend gereinigt (Zymo-SpinII Columns, Zymo). Anschließend wurden die gereinigten Fragmente den Angaben des Herstellers entsprechend im pGEM®-T Easy Vector System II (Promega) in einem molaren Verhältnis Vektor:Fragment von 1:3 ligiert. Die Reaktionen wurden ü. N. bei 4 °C ausgeführt.

### **2.2.5 Herstellung von LB-Ampicillin-Platten**

Zur Herstellung der Platten wurde LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren mit 1,5% Agar versetzt, nach dem Autoklavieren auf ca. 50 °C abgekühlt, mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erkalten bei 4 °C aufbewahrt. Waren die Bakterien mit Plasmiden transformiert, die die Möglichkeit des „Blau/Weiß-Screenings“ zur Überprüfung der Klonierungseffizienz boten, wurden vor dem Ausstreichen der Bakterien zunächst 100 µl 100 mM X-Gal in ddH<sub>2</sub>O und 20 µl 50 mg/ml IPTG in N,N'-Dimethylformamid ausplattiert.

### **2.2.6 Transformation von *E.coli* Zellen**

50 µl transformationskompetenter *E.coli* JM109 Zellen wurden mit einem Ligationsansatz (2 µl) versetzt. Es wurde sofort vorsichtig gemischt und 20 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach einem Wärmeschock (50 s bei 42 °C) wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gebracht und nach weiteren 2 Minuten mit 950 µl LB-Medium versetzt. Nach 90 Minuten Schütteln bei 37 °C wurden die Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten, die vorher mit X-Gal und IPTG behandelt worden waren, ausgestrichen und 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.7 Anzucht und Aufbewahrung transformierter *E.coli* - Stämme**

Am nächsten Tag wurden weiße Kolonien selektiert und in 6 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) ü. N. unter Schütteln (250 Upm) bei 37 °C inkubiert.

Zur längerfristigen Lagerung transformierter *E.coli* Zellen wurden 800 µl einer frischen Übernachtskultur mit 200 µl autoklaviertem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.2.8 Plasmid-Schnellpräparation aus 2 ml-Kulturen**

Aus 5 ml einer LB-Übernachtskultur wurden den Angaben des Herstellers entsprechend die Plasmide isoliert (Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit, Zymo). Die Orientierung der eingefügten Fragmente im Vektor wurde mittels enzymatischer Digestion interner Restriktionsstellen und anschließender Analyse der Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert.

### 2.2.9 Linearisierung des Vektors

Die Arbeit mit den Restriktionsendonukleasen Sall und BamHI erfolgte den Angaben des Herstellers (NEB) entsprechend. Es wurden 20 Einheiten Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.10 Reinigung von Nukleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanolfällung

Um Nukleinsäuren von Verunreinigungen zu säubern, wurden sie einem Phenol/Chloroform-Waschgang unterzogen. Dazu wurden die Proben mit einem Volumen einer 1:1 Mischung von Phenol und Chloroform versetzt und nach gutem Mischen (Vortex) zur Phasentrennung zentrifugiert (13000 Upm, 10 min, RT). Die obere, wässrige Phase wurde abpipettiert und mit einem Volumen Chloroform nochmals extrahiert, um Spuren von Phenol zu entfernen. Im Folgenden wurden die Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5-fachen Volumen 100%igem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13000 UpM, 15 min, RT) wurde das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.11 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde mit T7 RNA Polymerase (Promega) und dem Digoxigenin labeling kit (Roche) den Angaben der Hersteller entsprechend durchgeführt. In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden dazu gemischt:

DNA, linearisiert (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
5X Transkriptionspuffer	4 $\mu\text{l}$
DTT, 100 mM	2 $\mu\text{l}$
RNasin	1 $\mu\text{l}$
DIG labeling mix (10X)	2 $\mu\text{l}$
RNA Polymerase (T7)	1 $\mu\text{l}$ (20 U)
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 $\mu\text{l}$

Die Reaktion wurde eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz Lithiumchlorid (8 M) bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei -20 °C wurde zentrifugiert

(13000 Upm, 15 min, RT) und das Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, RT) wurde das Sediment an der Luft getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.3 Präparation der Hühnerembryonen**

Präpariert wurde in 1X PBS auf Eis. Die Embryonen wurden mit umgebendem Dottersack aus dem Dotter ausgeschnitten und die Vitellin-Membran und die Amnionmembranen um den Embryo entfernt. Bei Embryonen, die mehr als einen Tag alt waren, wurden die Gehirnentrikel und das Herz inzidiert, um einen besseren Durchfluss der Reagenzien zu erreichen. Präparierte Embryonen wurden ü. N. in 4% Formaldehyd in PBS bei 4 °C fixiert und mittels einer Alkoholreihe dehydriert (zweimal 5 min PBT, 5 min 50% Methanol in PBT, zweimal 5 min 100% Methanol). Anschließend wurden die Embryonen bei -20 °C gelagert.

### **2.4 *In situ* Protokoll**

Vor der Verwendung wurden die Embryonen rehydriert (5 min 75% Methanol in PBT, 5 min 50% Methanol in PBT, 5 min 25% Methanol in PBT, zweimal 5 min PBT). Danach wurden die Embryonen in einer Proteinase K-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert (E1: 4 min, E2: 6 min, E3: 10 min in 20 µg/ml Proteinase K (Roche) in PBT). Anschließend wurde 20 Minuten fixiert (4% Formaldehyd, 0,1% Glutardialdehyd in PBT) und einmal in PBT gewaschen. Die Embryonen wurden jeweils bis zum Absinken in 50% Hybridisierungslösung in PBT und in reiner Hybridisierungslösung inkubiert. Daraufhin wurde für eine Stunde bei 70 °C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Schließlich wurden die Embryonen ü. N. mit der entsprechenden Sonde (0,5 µg/ml in Hybridisierungslösung) bei 70 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zweimal 30 Minuten mit vorgewärmter Hybridisierungslösung und einmal 20 Minuten mit 50% Hybridisierungslösung in MABT bei 70 °C gewaschen. Es folgten zwei dreißigminütige Waschschrte in MABT bei Raumtemperatur. Die Embryonen wurden mit Blockierungslösung (MABT + 2% blocking reagent + 20% goat serum) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt und dann in einer Antikörperlösung (Anti-DIG-Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung in Blockierungslösung) ü. N. bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde überschüssiger Antikörper durch mindestens sechs Waschungen mit MABT (jeweils 30 min) entfernt. Danach wurde zweimal 10 Minuten in NTMT gewaschen und die Embryonen in NTMT + NBT + BCIP im Dunkeln bei 37 °C zwei bis sechs Stunden gefärbt.

## **2.5 Ligation**

Die Ligation der rechten Vitellin-Arterie wurde mittels eines gebogenen Wolframdrahtes von 0,5 mm Dicke durchgeführt (99). Ein Teil des Drahtes wurde unter die Arterie geschoben und hob sie dadurch an. Auf diese Weise wurde eine mechanische Obstruktion des Gefäßlumens erreicht. Sechs oder 24 Stunden nach Ligation wurden die Embryonen präpariert und für *in situ* Hybridisierungen und q-PCR-Untersuchungen verwendet.

## **2.6 Sauerstoff**

Es wurden Eier unter hypoxischen (15% O<sub>2</sub>), normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (70% O<sub>2</sub>) Bedingungen bebrütet. Am dritten Inkubationstag wurde jeweils die rechte Area vasculosa des Dottersackes freipräpariert und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurde sie für q-PCR-Untersuchungen verwendet.

## **2.7 Real-time quantitative PCR (q-PCR)**

Die RNA wurde mit Trizol isoliert und mit dem SuperscriptIII Reverse Transkriptase-Kit wurde cDNA synthetisiert wie oben beschrieben. Die real-time PCR wurde mit dem RealMasterMix (5 Prime) in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden 96-well Platten benutzt. Pro Reaktion wurde gemischt:

- 9 µl RealMasterMix
- 0,4 µl FW Primer (10 µM)
- 0,4 µl REV Primer (10 µM)
- 5 µl 50X verdünnte cDNA
- 5,2 µl ddH<sub>2</sub>O



PCR Reaktionen wurden bei einer annealing-Temperatur von 61 °C durchgeführt. Die benutzten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Linearität der Reaktionen wurde mittels Standardkurven (unverdünnte bis 10000X verdünnte cDNA) analysiert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese und Schmelzkurven-Analyse kontrolliert. Hprt1 wurde unter den untersuchten Bedingungen nicht reguliert und als Referenzgen benutzt.

<b>Primer</b>	<b>Fragmentgröße</b>
<b>Cx40</b>	147 bp
FW: CTTGCCACAGTCCTCTCTCC REV: GATGGGTGCCTCTTTTCAAC	
<b>Hprt 1</b>	253 bp
FW: TGACAAGTCAATCCCCATGA REV: TCCCACACTTCGAGGAGTTC	

**Tabelle 2:** Für die real-time PCR verwendete Primer.

## 2.8 Herzfrequenzen

Es wurden Hühnerembryonen unter hypoxischen (15% O<sub>2</sub>) und normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen bebrütet. Am dritten Tag der Inkubation wurde die Eischale am stumpfen Pol des Eies mit einer spitzen Schere perforiert. Nach Entnahme von 3 ml Eiweiß mittels einer 0,80 mm dicken Kanüle wurde mit einer Schere auf der Längsseite des Eies ein ca. 2 cm x 3 cm großes Fenster in die Schale und die darunter liegende äußere Eischalenmembran geschnitten, so dass der Hühnerembryo gut zu erkennen war. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde unter dem Stereomikroskop je eine Minute lang die Herzfrequenz der Embryonen gezählt.

Die Analyse der Ergebnisse wurde mittels des Statistikprogrammes SPSS durchgeführt. Es wurde ein zweiseitiger Student *t*-Test benutzt. Signifikanz der Ergebnisse wurde als  $p < 0,05$  definiert.

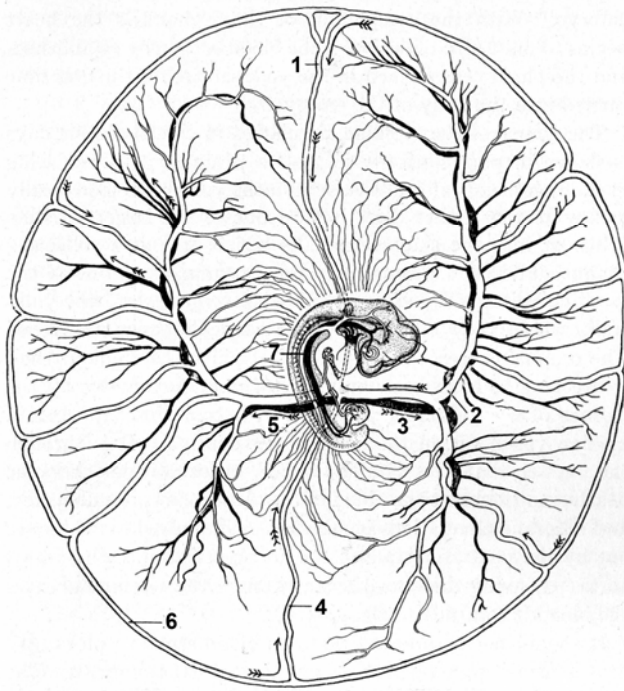
## **B      ERFORSCHUNG      VON      ARTERIELLEN      UND      VENÖSEN STRÖMUNGSSCHARAKTERISTIKA**

### **2.9 Intravitalmikroskopie**

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Dottersackzirkulation drei Tage alter Hühnerembryonen (Abb. 7) stand folgende Messanordnung zur Verfügung:

Zur Aufbewahrung der Hühnerembryonen diente eine kleine Glasschale von 8 cm Durchmesser und 4 cm Höhe. Die kleine Schale wurde in eine 5 cm hohe Glasschale gestellt, welche auf dem Mikroskoptisch stand und durch ein Schlauchsystem und eine Pumpe in einen Wasserkreislauf mit einem Wasserbad eingebunden wurde. So konnte eine konstante Wassertemperatur von 39 °C in der großen Schale aufrechterhalten werden, die eine Temperatur von 37 °C in der kleinen Schale und damit für den Embryo gewährleistete. Um Wärme- und Feuchtigkeitsverlust durch Verdunstung zu reduzieren, wurde die kleine Glasschale mit einer runden Plexiglasscheibe abgedeckt, die nur eine Öffnung für das Objektiv freiließ.

Das Intravitalmikroskop (Zeiss, Axiotech vario 100HD) war auf dem Mikroskoptisch befestigt. Es wurde ein 10x Objektiv (Zeiss, Achroplan) verwendet. Als Lichtquelle für die Durchlichtbeleuchtung des Präparates diente eine Xenon-Lampe. War die Geschwindigkeit der Blutströmung so schnell, dass mit bloßem Auge keine einzelnen Erythrozyten mehr erkennbar waren, wurden zusätzlich Aufnahmen mit einer asynchronen Stroboskop-Beleuchtung (Strobex, Modell 11 360, Chadwick-Melmuth Electronics) durchgeführt. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer Schwarz-Weiß-Kamera (Kappa, CF8/5MXDRE) aufgenommen. Die Aufnahmen dauerten pro Embryo jeweils ungefähr 30 Minuten. Es wurden je 10 bis 15 Gesichtsfelder aufgenommen.



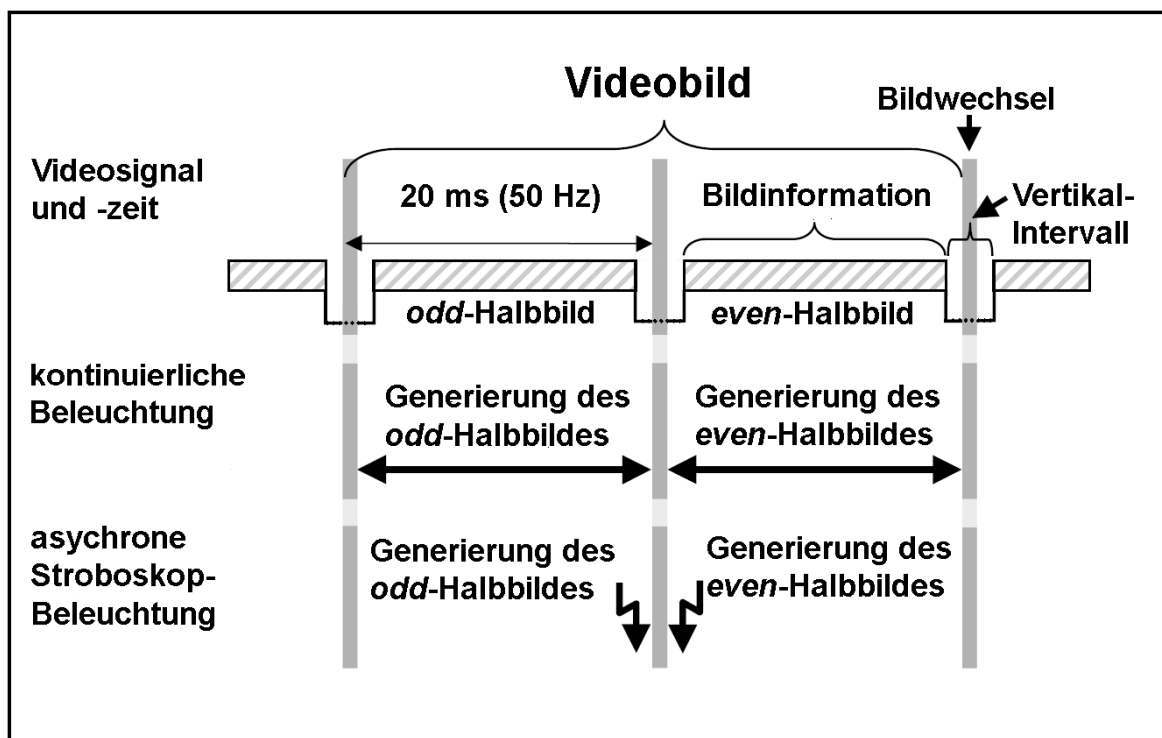
**Abbildung 7:** Darstellung eines drei Tage alten Hühnerembryo mit umgebendem Dottersack (nach (64)). 1: anteriore Vitellin-Vene, 2: rechte Vitellin-Vene, 3: rechte Vitellin-Arterie, 4: posteriore Vitellin-Vene, 5: linke Vitellin-Arterie, 6: Sinus terminalis, 7: dorsale Aorta. Die Richtung der Blutströmung ist durch Pfeile gekennzeichnet.

## 2.10 Auswertung der Geschwindigkeiten und Durchmesser

Kriterium für die Definition eines Gefäßes als Arterie oder Vene war die Richtung der Blutströmung. Mit Hilfe von in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Pries entwickelten digitalen Bild-Analyse-Systemen wurden aus den Videoaufnahmen (DSR 20P, Sony) die Durchmesser der Gefäße bestimmt (78).

Außerdem wurden die axialen Strömungsgeschwindigkeiten in den Gefäßen ermittelt. Dabei wurde eine Messungslinie in die Mitte eines Gefäßes gelegt. Entlang dieser Linie wurden für die beiden korrespondierenden Halbbilder eines Bildes mit einer variablen Nummer von Messungszyklen (100 Zyklen entsprechen z. B. 4 Sekunden) Intensitätsmuster der sich in den Gefäßen fortbewegenden Blutzellen aufgenommen. Die axiale Strömungsgeschwindigkeit wurde als Quotient von räumlicher Verschiebung des Intensitätsmusters zur Zeitverzögerung der Aufnahmen berechnet. Die Maximalgeschwindigkeit, die über diesen Ansatz gemessen werden kann, ist von der optischen Vergrößerung und der niedrigsten erreichbaren Zeitverzögerung zwischen den Aufnahmen abhängig. In klassischen Versuchsaufbauten mit einem 50 Hz - Videorekorder entspricht diese Verzögerung einem Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Halbbildern von 20 ms (Abb. 8). Diese Zeitverzögerung und die typische

Länge intravaskulärer optischer Muster von ca. 10 bis 20  $\mu\text{m}$  begrenzt die maximal nachweisbare Geschwindigkeit auf ungefähr 1 mm/s. Durch Benutzung der asynchronen Stroboskoplampe können Geschwindigkeiten bis zu 40 mm/s erfasst werden (78, 65). Diese Lampe beleuchtet das erste (odd) Halbbild eines Videobilds kurz vor dem Bildwechsel, während das zweite (even) Halbbild kurz nach dem Bildwechsel beleuchtet wird, was zu einer Zeitverzögerung von nur 0,5 ms führt.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung von Videosignal, -zeit und kontinuierlicher und asynchroner Stroboskop-Beleuchtung (modifiziert nach (65)).

(Oben) Ein Videobild ist aus zwei Halbbildern (odd, even) aufgebaut, die jeweils 20 ms lang sind. Sie werden durch das Vertikal-Intervall unterbrochen (Datentransfer). (Mitte) Unter kontinuierlicher Beleuchtung wird die gesamte Belichtungszeit der Halbbilder zur Aufnahme genutzt. (Unten) Asynchrone Stroboskop-Beleuchtung führt zu einer kurzen Belichtungszeit, der Abstand zwischen den Aufnahmen der Halbbilder kann auf ca. 0,5 ms reduziert werden.

## 2.11 Berechnete hämodynamische Parameter

Weiterführende Analysen der hämodynamischen Bedingungen in der Dottersackzirkulation wurden unter Benutzung der Software Microsoft Office Excel durchgeführt. Aus den ermittelten Geschwindigkeitsverläufen wurden die Beschleunigungsverläufe ( $dv/dt$ ) errechnet. Anschließend wurde für jedes Gefäß manuell sowohl die Maximalbeschleunigung ( $a^{max}$ , ( $\mu\text{m/s}^2$ )) als auch die Amplitude der axialen Strömungsgeschwindigkeit ( $A$ , ( $\mu\text{m/s}$ )) bestimmt. Division der Maximalbeschleunigung durch die axiale Strömungsgeschwindigkeit ( $v$ , ( $\mu\text{m/s}$ )) ergibt die relative Maximalbeschleunigung  $a^{max}(rel)$  ( $\text{s}^{-1}$ ), Division der Amplitude durch die axiale Strömungsgeschwindigkeit die relative Amplitude ( $A(rel)$ ). Die mittlere Pseudo-Scherrate ( $\gamma_{(p)}$ , ( $\text{s}^{-1}$ )) ist der Quotient aus axialer Strömungsgeschwindigkeit und Durchmesser ( $d$ ). Der Pulse Slope Index (PSI) berechnet sich als Quotient aus relativer Maximalbeschleunigung und mittlerer Pseudo-Scherrate.

Mittels des Statistikprogrammes SPSS wurde eine ROC-Kurven Analyse der Ergebnisse durchgeführt.

## C FUNKTION VON CONNEXINEN IM GEFÄßSYSTEM

### 2.12 Connexin-Hemmung durch Carbenoxolon

Am dritten Tag der Inkubation wurde die Eischale am stumpfen Pol des Eies mit einer spitzen Schere perforiert. Nach Entnahme von 3 ml Eiweiß mittels einer 0,8 mm dicken Kanüle wurde mit einer Schere auf der Längsseite des Eies ein ca. 2 cm x 3 cm großes Fenster in die Schale und die darunter liegende äußere Eischalenmembran geschnitten. Die Öffnung wurde mit Klebefilm abgedichtet, um den Embryo vor Austrocknung zu schützen. Anschließend wurde das Ei weitere sieben Tage bei 37 °C inkubiert.

Am zehnten Inkubationstag wurde durch das Fenster ein Silikonring von 1 cm Durchmesser auf die Chorion-Allantois-Membran gelegt. In diesen Silikonring wurden 50  $\mu\text{l}$  einer 500  $\mu\text{M}$  Carbenoxolon-Lösung (in PBS) pipettiert. Als Kontrolle diente die Applikation von 50  $\mu\text{l}$  PBS. Die Eier wurden in einen Kunststoffbehälter gestellt, welcher

zwischen zwei Wärmeplatten unter einem Stereomikroskop (Leica) platziert und zur besseren Wärmeisolation mit Aluminiumfolie umwickelt wurde. Die obere Wärmeplatte wurde auf 39 °C, die untere auf 37 °C eingestellt, um Kondensation an der oberen Wärmeplatte zu vermeiden. Der Kunststoffbehälter wies an der oberen Seite eine Öffnung von 5 cm x 7 cm auf. In der Mitte der ihn bedeckenden Wärmeplatte war eine Glasscheibe von 5 cm Durchmesser eingelassen, durch die photographische Aufnahmen der Fenster-Region getätigt werden konnten, ohne das Ei zu bewegen.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit der Software MetaMorph verarbeitet. In den ersten 15 Minuten nach Applikation der Substanzen wurden im Abstand von 10 Sekunden Aufnahmen getätigt, in den darauf folgenden 12 Stunden alle 10 Minuten.

## **2.13 Auswirkung von Cx40-Defizienz**

### **2.13.1 Präparation der Retina**

Vier bis sechs Tage alte C57/BL6-Mäuse wurden dekapitiert. Ihre Augen wurden aus der Orbita entfernt und ü. N. in 4% Formaldehyd in PBS bei 4 °C fixiert. Die Retinae wurden unter einem Stereomikroskop durch Entfernung der Kornea, der Linse und des Glaskörpers freipräpariert. Die Sklera wurde vorsichtig entfernt, die Retinae dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen und ü. N. in Blockierungslösung bei 4 °C inkubiert.

### **2.13.2 Färbeprotokoll**

Am nächsten Tag wurden die Retinae dreimal 5 Minuten mit PBS und dreimal 20 Minuten mit Pblec-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden sie ü. N. in biotinyliertem GSL I-Isolectin B4 (Vector Laboratories) (in einer 1:25 Verdünnung in Pblec-Puffer) bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Retinae fünfmal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit Cy3-markiertem Streptavidin (Amersham Biosciences) (in einer 1:100 Verdünnung mit Inkubationslösung) im Dunkeln bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Retinae dreimal 10 Minuten mit PBS im Dunkeln bei Raumtemperatur gewaschen. Die Retinae wurden an vier Stellen im peripheren Bereich radiär zur Mitte der Papilla nervi optici hin eingeschnitten, so dass

sie ohne Faltenbildung flach ausgebreitet werden konnten. Anschließend wurden sie möglichst blasenfrei auf einem Objektträger in Moviol eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Retinae wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Exzitations- und Emissions-Filtern für den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 untersucht. Die Retinae wurden mit einem 10x-Objektiv fotografiert und mit dem Bildanalyse-System MetaVue vermessen.

### **2.13.3 Auswertung**

Regionen in der Peripherie der Retina wurden manuell selektiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass in den ausgewählten Gebieten je eine große Arterie und Vene mit den umgebenden Kapillaren erfasst wurden.

Verzweigungspunkte: Es wurden Gebiete mit einer Fläche von 76100 bis 184500 Pixel analysiert. Die Verzweigungspunkte wurden manuell ausgewählt. Verzweigungspunkte wurden als Stellen definiert, an denen mindestens zwei Gefäße aufeinander treffen. Gefäßdichte: Als Maß für die Gefäßdichte wurde der Prozentsatz der angefärbten Regionen der Bilder miteinander verglichen. Es wurden Gebiete mit einer Fläche von 10200 bis 261000 Pixel analysiert. Mit der Software MetaVue wurde der Kontrast des Bildes verstärkt, um Hintergrundfärbung zu verringern.

Die Analyse der Ergebnisse wurde mittels des Statistikprogrammes SPSS durchgeführt. Es wurde ein zweiseitiger Student  $t$ -Test benutzt. Signifikanz der Ergebnisse wurde als  $p < 0,05$  definiert.

## 2.14 Verwendete Lösungen

- **BCIP Stammlösung** 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid
  
- **Blockierungslösung** 1X PBS (pH 7,4)  
1% bovine serum albumine (BSA)  
0,5% Triton X100
  
- **Hybridisierungslösung** 50% Formamid  
1,3X SSC pH 5  
5 mM EDTA pH 8  
50 mg/ml Yeast RNA  
0,2% Tween 20  
100 µg/ml Heparin  
0,5% CHAPS  
ddH<sub>2</sub>O
  
- **Inkubationslösung** 1X PBS (pH 7,2)  
0,5% BSA  
0,25% Triton X100
  
- **LB-Medium (1 l)** 10 g Bacto Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
eingestellt auf pH 7
  
- **MABT, pH 7,5** 0,10 M Maleinsäure  
0,15 M NaCl  
0,19 M NaOH  
1,1% Tween 20  
ddH<sub>2</sub>O
  
- **NBT Stammlösung** 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid



<b>- NTMT</b>	0,1 M NaCl 0,1 M Tris.HCl 1M pH 9,5 50 mM MgCl <sub>2</sub> 1% Tween 20 ddH <sub>2</sub> O
<b>- Pblec-Puffer</b>	1X PBS (pH 6,8) 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM MnCl <sub>2</sub> 1% Triton X100
<b>- PBS 10X</b>	1,46 M NaCl 0,06 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,03 M KCl ddH <sub>2</sub> O
<b>- PBT</b>	1X PBS + 0,1% Tween 20
<b>-SSC 20X</b>	3,00 M NaCl 0,30 M Na <sub>3</sub> .citrat.2H <sub>2</sub> O eingestellt auf pH 5 ddH <sub>2</sub> O

## 2.12 Verwendete Chemikalien

- Anti-DIG-Antikörper (Roche)
- BCIP (Roche)
- blocking reagent (Roche)
- CHAPS (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Serva)
- DIG RNA Labeling Mix (Roche)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Ethanol (Serva)
- Formamid (Sigma-Aldrich)
- Glutardialdehyd (Merck)
- Glycerin (Serva)
- Goat Serum (GS) (Invitrogen)
- Heparin (Sigma-Aldrich)
- IPTG (Serva)
- KCl (Serva)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Serva)
- Maleinsäure (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Sigma-Aldrich)
- $\text{MgCl}_2$  (Serva)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Serva)
- $\text{Na}_3\text{.citrat.}2\text{H}_2\text{O}$  (Serva)
- NaCl (Serva)
- NaOH (VWR)
- NBT (Roche)
- N,N - Dimethylformamid (Serva)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
- Phenol (Sigma-Aldrich)
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- Tris.HCl (Serva)
- Trizol® Reagent (Invitrogen)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- X-Gal (Serva)
- Yeast RNA (Sigma)