

4. DISKUSSION

A EXPRESSION UND REGULATION VON CONNEXINEN

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der vaskulären Expression von Cx37, Cx40 und Cx43 in der embryonalen Entwicklung, wobei der Schwerpunkt auf der Analyse arteriovenöser Differenzen lag.

Die Untersuchungen wurden am Dottersack von Hühnerembryonen durchgeführt. Dieses Modell hat verschiedene Vorteile: Das befruchtete Vogelei ist eine selbständige funktionelle Einheit, die im Gegensatz zum Säugetierembryo keinen Einflüssen durch das Muttertier unterliegt. Eine Manipulation der Umweltbedingungen (z. B. Sauerstoffpartialdruck) ist bei der Bebrütung im Inkubator leicht möglich und hat direkten Einfluss auf die Entwicklung des Embryos. Außerdem bietet dieses Modell neben einer guten Visualisierbarkeit den Vorteil, dass seine Gefäße einem stereotypen Entwicklungsprozess von Sprouting, Remodeling und Maturation unterliegen.

Mittels *in situ* Hybridisierung und real-time PCR wurde die Expression von Cx37, Cx40 und Cx43 in den Dottersäcken ein bis drei Tage alter Hühnerembryonen untersucht. So wurden die Phasen von der Entwicklung eines primären bis hin zu einem etablierten sekundären Gefäßplexus erfasst. Es werden vier Schritte in der Ausbildung eines arteriovenösen Gefäßnetzwerkes im Dottersack des Huhns beschrieben (61): 1) Schon vor Beginn der Blutzirkulation existieren Endothelzellen, die für Arterien oder Venen spezifische Gene exprimieren. Diese Zellen sind spezifisch an einem posterioren (arteriellen) und anterioren (venösen) Pol des Dottersackes gruppiert. Die Endothelzellen beider Gefäßtypen sind anfänglich in einer zweidimensionalen Ebene zueinander angeordnet (Cis-Cis-Konfiguration). 2) Kurz nach Beginn der Blutzirkulation bildet sich am posterioren Pol der Gefäßplexus der Vitellin-Arterie aus. 3) Das Fortschreiten der arteriellen Gefäßentwicklung in distale Gebiete des Dottersackes wird durch Abtrennung kleiner arterieller Seitengefäße erreicht. 4) Diese Seitengefäße bilden dorsal zu den Arterien gelegene Sprossungen aus, die zu den primären Venenplexus hin wachsen. So bilden Gefäße, die eigentlich zum arteriellen Gefäßbett gehörten, nun einen Teil der Venen. Der auf diese Weise entstandene sekundäre venöse Plexus liegt

dorsal zu den Arterien und die Endothelzellen beider Gefäßtypen liegen in dreidimensionaler Cis-Trans-Konfiguration zueinander.

Für alle drei untersuchten Connexine konnte eine Expression im Gefäßplexus des Dottersackes nachgewiesen werden. Die Expression von Cx43 war in venösen und arteriellen Gefäßen im Embryo und in Gefäßen der transparenten Zone des Dottersackes lokalisiert. Cx37 und Cx40 hingegen wiesen ein arteriell spezifisches Expressionsmuster auf. Beide Connexine wurden in intraembryonalen Arterien exprimiert. Während die extraembryonale Expression von Cx37 auf größere arterielle Gefäße beschränkt blieb, war Cx40 in Arterien der gesamten Dottersackzirkulation nachweisbar. Basierend auf diesen Ergebnissen kann Cx40 als guter Marker für Arterien bezeichnet werden. Die Expression von Cx40 im Gefäßsystem des Dottersackes war mittels *in situ* Hybridisierung ab dem Beginn der embryonalen Herzaktion nachweisbar (13 Somiten-Stadium, erster Entwicklungstag) und nahm bis zum dritten Entwicklungstag zu. Vor Beginn der Blutzirkulation war Cx40 im primären Gefäßplexus nicht detektierbar.

Es wurden verschiedene arterielle Marker identifiziert (1, 40, 41, 59, 66, 70, 71, 94, 104, 106, 108, 111), die eine essentielle Funktion für das Gefäßwachstum und die Entwicklung einer Gefäßidentität auszuüben scheinen. Interessanterweise werden Ephrine und Neupiline auch im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert (29, 38, 51, 54). Mechanismen, für die Steuerung des axonalen Wachstums verantwortlich sind, scheinen also auch für das Gefäßwachstum von Bedeutung zu sein (8, 37, 72).

Deletion von Neupilin1 (NRP1), einem sehr bekannten arteriellen Marker, führt in der Maus unter anderem zu schweren Gefäßdefekten wie der Agenesie oder Transposition großer Gefäße, einem persistierenden Truncus arteriosus und vermindertem und desorganisiertem extraembryonalen Gefäßwachstum (47, 101). Die vaskuläre Regression in Embryonen mit NRP1-Defizienz ist konsistent mit der Beobachtung, dass eine NRP1-Überexpression zu vermehrter Gefäßbildung führt (49) und deutet auf eine Beteiligung von NRP1 an der embryonalen Gefäßbildung hin. EphrinB2, ein weiterer bekannter arterieller Marker, spielt eine kritische Rolle im Remodellierungsprozeß vom primären Plexus hin zu einem hierarchisch organisierten Gefäßnetzwerk aus Arterien und Venen (30, 34, 53). Mitglieder des notch-Signalwegs wie Dll4 und gridlock werden

ebenfalls arteriell-spezifisch exprimiert (104, 111). Sie werden mit arterieller Identität von Endothelzellen in Verbindung gebracht. Der notch-Signalweg scheint arterielle Differenzierung zu induzieren und die venöse Differenzierung zu supprimieren (59). Im Menschen führen Mutationen von notch3 und jagged1-Genen zu CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) oder zum Alagille-Syndrom, die beide mit vaskulären Fehlbildungen einhergehen (46, 63, 73).

Die derzeit bekannten arteriellen Marker spielen vor allem eine direkte Rolle für die Steuerung des Gefäßwachstums oder die Gefäßidentität. Sie werden von den Endothelzellen schon vor ihrer Zusammenlagerung zum primären Gefäßnetz exprimiert. Die Expression von Cx40 hingegen war erst mit Beginn der embryonalen Blutzirkulation nachweisbar. Von diesem Moment an war Cx40 spezifisch in Arterien der Dottersackzirkulation lokalisiert. Basierend auf diesen Ergebnissen kann Cx40 als guter Marker für funktionelle, perfundierte Arterien bezeichnet werden. Vergleichbare Marker sind bisher noch nicht bekannt.

Die spezifische Expression von Cx40 in Arterien führte zu folgenden Fragestellungen:

1. Über welche Faktoren wird die Expression von Cx40 reguliert?
2. Welche Funktion übt Cx40 in Arterien aus?

4.1 Regulation der Connexin-Expression

Um Einblicke in die der arteriellen Spezifität von Cx40 zugrunde liegenden Mechanismen zu gewinnen, wurde die Abhängigkeit der Cx40-Expression von zwei wichtigen epigenetischen Faktoren untersucht, die in Arterien und Venen unterschiedlich sind: Sauerstoff und Strömung.

4.2 Sauerstoff als potentieller Regulator der Connexin-Expression

In der Dottersackzirkulation liegt der Sauerstoffgehalt in Arterien durchschnittlich niedriger als in Venen (10). Sauerstoff könnte daher eine Ursache für die arteriell-spezifische Expression von Cx40 sein. Ein niedriger Sauerstoffgehalt (Hypoxie) sollte dann in embryonalen Gefäßen zu einer Induktion der Cx40-Expression führen. Ein hoher Sauerstoffgehalt hingegen sollte die Expression von Cx40 supprimieren.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden befruchtete Hühnereier drei Tage lang bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert. Die anschließend durchgeführte real-time PCR auf den Dottersäcken der Hühnerembryonen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Cx40 zwischen in 12% und 70% O₂ inkubierten Embryonen. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die Expression von Cx40 in den Gefäßen des Dottersackes nicht durch Sauerstoff reguliert wird. Der unterschiedliche Sauerstoff-Partialdruck in Arterien und Venen kann daher nicht der Grund für die Unterschiede in der Cx40-Expression sein. Die Herzfrequenzen drei Tage alter Embryonen in Normoxie und Hypoxie waren vergleichbar und deuten darauf hin, dass keine Unterschiede in der Perfusion vorlagen.

4.3 Blutströmung als potentieller Regulator der Connexin-Expression

Ein zweiter möglicher Grund für die arterielle Spezifität von Cx40 könnten hämodynamische Parameter sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde durch Ligatur einer zentral gelegenen Arterie des Dottersackes die Blutströmung in den extraembryonalen Membranen moduliert. In der anschließenden Untersuchung mittels real-time PCR und *in situ* Hybridisierung wurde das Expressionsniveau der ligierten mit der unligierten Seite verglichen. In der ligierten Seite sank die Cx40-Expression um den Faktor 4 ab. In der *in situ* Hybridisierung ließ sich keine Expression von Cx40 in der ligierten Seite nachweisen. In der unligierten Seite konnte sogar eine Zunahme der Expression auch auf eigentlich venöse Gebiete festgestellt werden, die auf die veränderten Strömungsverhältnisse zurückzuführen sein könnte.

Es ist daher anzunehmen, dass die arteriell-spezifische Expression von Cx40 nicht durch Sauerstoff, wohl aber durch hämodynamische Parameter reguliert wird. Dies wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die Expression von Cx40 erst mit Beginn der Blutzirkulation im Dottersack nachweisbar war.

Mit Beginn der Blutzirkulation ist das kardiovaskuläre System permanent biomechanischen Stimuli ausgesetzt. Durch die Blutströmung entstehen mechanische Kräfte, die auf die Gefäßwand wirken: Schubspannung und Wandspannung (103). Diese hämodynamischen Parameter beeinflussen nicht nur die Struktur und Funktion des sich entwickelnden Herzens (91), sondern haben auch Einfluss auf die Zellen, die die Wände des Gefäßnetzwerkes bilden (12). Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass

biomechanische Stimuli eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung vaskulärer Integrität und der Entwicklung von Gefäßkrankheiten spielen. Beispielsweise entwickeln sich die ersten arteriosklerotischen Läsionen typischerweise in der Nähe von Verzweigungspunkten und großen Krümmungen in der arteriellen Gefäßbahn - Regionen mit turbulenter Strömung und Strömungsumkehr. Im Gegensatz dazu scheinen unverzweigte arterielle Gefäße, die einem gleichförmigen laminaren Strömungsmuster ausgesetzt sind, vor der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen geschützt zu sein (3, 35). Die auffallend geometrisch definierte Lokalisation der Läsionen weist deutlich auf einen wichtigen Einfluss lokaler hämodynamischer Faktoren auf die zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen hin.

Das vaskuläre Endothel ist nicht nur eine passive Barriere zwischen Blut und der angrenzenden Gefäßmuskelschicht, sondern spielt auch eine Schlüsselrolle in der Signalübermittlung biomechanischer und humoraler Stimuli (33). Die endotheliale Einzelzellschicht ist dazu fähig, akute Veränderungen in der Blutströmung wahrzunehmen und durch die Sekretion oder Metabolisierung vasoaktiver Substanzen (z.B. NO) auf sie zu reagieren (13). Auch bei Remodellierungsprozessen als Reaktion auf chronische Änderungen der Hämodynamik konnte eine Beteiligung endothel-abhängiger Mechanismen nachgewiesen werden (58). Schubspannung *in vitro* kann verschiedene Reaktionen der Endothelzellen auslösen. Beispiele sind unter anderem eine Reorganisation des Zytoskeletts, Veränderungen metabolischer und synthetischer Aktivitäten und Modulation des Zellzyklus (19, 20, 68, 74). Studien *in vitro* haben gezeigt, dass Schubspannung direkten Einfluss auf die Transkription von Genen in kultivierten endothelialen Monolayern haben kann (103). Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Qualität der biomechanischen Stimuli das Genexpressionsmuster von Endothelzellen beeinflusst (5, 32).

Eine zentrale Frage in der Gefäßbiologie ist nun, wie mechanische Kräfte von den Zellen der Gefäßwand registriert und übermittelt werden. Die Identifikation von relevanten Signalkaskaden und „shear-stress-responsive elements“ in den Promotorregionen mehrerer durch Schubspannung regulierter Gene haben Einsicht in die zellulären Mechanismen geliefert, die Schubspannungsstimuli und genetische Regulationsereignisse miteinander verbinden (75, 83).

B ERFORSCHUNG VON ARTERIELLEN UND VENÖSEN STRÖMUNGSSCHARAKTERISTIKA

Sowohl qualitative als auch quantitative hämodynamische Parameter beeinflussen die Genexpression in Endothelzellen *in vitro* (5, 32). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob hämodynamische Differenzen zwischen Arterien und Venen *in vivo* die Grundlage für eine arteriell- bzw. venös spezifische Expression von Genen bilden könnten. Hierzu wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen der Dottersackzirkulation durchgeführt, um arteriovenöse Strömungscharakteristika detailliert zu analysieren.

In Arterien war eine ausgeprägt pulsatile Strömung nachzuweisen (relative Amplitude $(3,35 \pm 4,71)$, relative Maximalbeschleunigung $(0,11 \pm 0,46) \text{ s}^{-1}$). Die Pulsatilität der Blutströmung war in Venen viel geringer als in Arterien und fast vollständig verloren (relative Amplitude $(0,67 \pm 0,54)$, relative Maximalbeschleunigung $(0,007 \pm 0,02) \text{ s}^{-1}$). Die Blutströmungsgeschwindigkeit in Venen war mit durchschnittlich $(1120 \pm 880) \mu\text{m/s}$ rund dreimal höher als in Arterien ($(361 \pm 209) \mu\text{m/s}$). Diese Beobachtungen sind bemerkenswert, da sie zum Teil der Situation in adulten Geweben widersprechen. Auch adulte Venen zeigen allenfalls geringfügig pulsatile Strömungsprofile. Ihre Strömungsgeschwindigkeiten sind jedoch niedriger als in Arterien. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied könnte sein, dass in der analysierten embryonalen Entwicklungsstufe, im Gegensatz zum adulten Gefäßbett, weniger Venen als Arterien vorhanden sind.

Einige der analysierten arteriellen Gefäße zeigten neben positiven auch negative Werte für die gemessenen Geschwindigkeiten. Diese ungewöhnliche Beobachtung könnte durch eine noch unvollständige Entwicklung der Herzklappen in dem untersuchten Entwicklungsstadium zu erklären sein (60), die dazu führt, dass es während eines Herzzyklus zu einer systolischen Vorwärtsbewegung und einer Rückflussbewegung des Blutes während der Diastole kommt. Da die Dauer und die Geschwindigkeit der Vorwärtsströmung die der Rückwärtsströmung übertreffen, kommt es dennoch netto zu einer Vorwärtsbewegung des Blutes während eines Herzzyklus.

Die Scherrate ist als Quotient von Strömungsgeschwindigkeit und Durchmesser definiert. Da axiale Strömungsgeschwindigkeiten gemessen wurden, wird der berechnete Parameter als mittlere Pseudo-Scherrate bezeichnet. Als Folge der hohen Geschwindigkeiten in den Venen lag auch die Pseudo-Scherrate mit $(12,15 \pm 8,94) \text{ s}^{-1}$ in Venen deutlich höher als in Arterien ($(4,84 \pm 2,16) \text{ s}^{-1}$). Da der Hämatokrit in diesem Modell nicht ermittelt wurde, konnte die apparente Viskosität und damit die Schubspannung nicht errechnet werden.

Es gibt keine mit dieser Studie vergleichbaren Messungen. Dies liegt vor allem daran, dass nur wenige Methoden für hämodynamische Analysen etabliert sind. Invasive Techniken in jungen Embryonen stellen eine Herausforderung dar, da die Gefäße in dieser Entwicklungsstufe sehr dünn sind und das Gerinnungssystem noch nicht vollständig ausgebildet ist. Eine elegante alternative Methode an 8,5 bis 10,5 Tage alten Mäuseembryonen wurde durch Jones *et al.* verwendet (44). Diese Studie nutzte transgene green fluorescent protein (GFP) Expression in primitiven Erythroblasten für quantitative Messungen mittels Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie.

Zusammenfassend sind die zwei größten hämodynamischen Unterschiede zwischen Arterien und Venen der Dottersackzirkulation 1) die Pulsatilität der Blutströmung (ausgedrückt durch relative Amplitude und relative Maximalbeschleunigung) und 2) die Geschwindigkeiten (und daraus resultierenden Scherraten). Die größte Trennschärfe dieser Parameter hat die relative Maximalbeschleunigung (AUC 0,97). Kombination der relativen Maximalbeschleunigung und mittleren Pseudo-Scherrate in Form des Pulse Slope Index (PSI) erhöht die Trennschärfe auf 0,98 (AUC).

Im Gegensatz zur Situation im Embryo liegen Strömungsgeschwindigkeit und damit auch Scherrate im adulten Gefäßbett in Arterien höher als in Venen. Die arteriell-spezifische Expression von Cx40 ist jedoch auch für adulte Gewebe bekannt. Daher kann postuliert werden, dass Strömungsgeschwindigkeit und Schubspannung an sich nicht die Ursache für die Gefäßtyp-spezifische Expression von Cx40 sind. Vor allem oszillatorische Änderungen in der Blutströmung, wie sie in Arterien auftreten, scheinen für die Expression von Cx40 von Bedeutung zu sein. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die hohen Schubspannungswerte in adulten Arterien andere Effekte auslösen als die relativ niedrigen Schubspannungswerte in embryonalen Arterien. Auch könnten für

die Induktion der Cx40-Expression andere Mechanismen verantwortlich sein als für die Aufrechterhaltung.

C FUNKTION VON CONNEXINEN IM GEFÄßSYSTEM

Die arteriell-spezifische Lokalisation von Cx40 innerhalb des Gefäßsystems lässt vermuten, dass es eine arteriell-spezifische Funktion innehat. Der dritte Teil dieser Arbeit untersuchte daher die Frage, welche Funktion Cx40 in Arterien ausübt.

Um Anhaltspunkte für die Bedeutung von Connexinen für die Gefäßhomöostase zu gewinnen, wurde 1) das CAM-Modell benutzt und 2) die Auswirkung von Cx40-Defizienz auf das retinale Gefäßnetzwerk der Maus untersucht.

4.4 Connexin-Hemmung durch Carbenoxolon

Das CAM-Modell hat sich in der Biowissenschaft bereits für viele Versuche bewährt. So dient es unter anderem zur Untersuchung von Ionentransporten (23), des Gasaustausches (69), für Experimente mit Tumortransplantaten (50) sowie als Angiogenese-Modell (18, 84, 87, 100). Applikation des isotyp-unspezifischen Connexin-Hemmstoffes Carbenoxolon auf die Gefäße der Chorion-Allantois-Membran hatte schon nach kurzer Zeit (10 min) Kontraktionen arterieller Gefäße zur Folge. Diese Kontraktionen führten letztendlich zur Ausbildung einer avaskulären Zone. Venen waren an der Akutreaktion nicht beteiligt und schienen sich nur indirekt geringfügig zu verändern. Hierfür scheint der geringere arterielle Zufluss verantwortlich zu sein. Die Beobachtung, dass die Reaktion auf eine Blockade von Connexinen zuerst in Arterien stattfindet, stimmt mit dem Expressionsmuster überein und ist ein Hinweis dafür, dass es eine spezifische Rolle von Connexinen in Arterien gibt.

4.5 Auswirkung von Cx40-Defizienz

Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von Cx40 für funktionelle Gefäßnetzwerke wurde durch Analyse retinaler Gefäßnetzwerke Cx40-defizienter Mäuse (Cx40^{-/-}) gewonnen. Während Gefäßnetzwerke der Wildtyp-Mäuse eine recht dichte, fein verzweigte Struktur aufwiesen, waren die Gefäßnetzwerke der Cx40^{-/-}-Mäuse relativ ausgedünnt und grobmaschig. Quantifizierungen der Unterschiede bestätigten diesen

Eindruck und zeigten eine signifikante, um 20% verminderte Gefäßdichte und eine signifikante, um 26% geringere Anzahl von Verzweigungspunkten.

Intravaskuläre Kommunikationsprozesse sind sowohl für die Ausbildung (97) als auch für die Aufrechterhaltung funktioneller Gefäßnetzwerke essentiell (16, 80, 81). Ein denkbarer Mechanismus ist eine Zell-Zell-Kommunikation in der Gefäßwand über transmembranäre Kanäle, die als gap junctions bekannt sind (14, 28, 92). Gap junctions sind aus Connexinen aufgebaut, und im kardiovaskulären System werden Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 exprimiert. Die spezifische Lokalisation der verschiedenen Connexine innerhalb des kardiovaskulären Systems lässt vermuten, dass isoform-spezifische Funktionen oder Regulationsmechanismen existieren.

Deletion von Cx40 in der Maus führt zu Störungen in der atrioventrikulären Überleitung, Rechtsschenkelblock und einer Prädisposition für Arrhythmien, in Übereinstimmung mit der Expression von Cx40 im Atrium und im kardialen Leitungssystem (48, 96). Cx37^{-/-}-Mäuse weisen einen kardiovaskulär unauffälligen Phänotyp auf (95). Trotz prominenter Expression von Cx37 und Cx 40 in Endothelzellen kommt es nach Ablation eines dieser Connexine nicht zu einem schweren vaskulären Phänotyp und es wurden bisher keine Entwicklungsstörungen in den Gefäßen beobachtet. Der in dieser Arbeit beobachtete vaskuläre Phänotyp kann daher als bemerkenswert bezeichnet werden. Da Cx37 und Cx40 in einem Teil der Endothelzellen coexprimiert werden, könnten diese Connexine funktionell überlappen und manche vaskulären Phänotypen nur beobachtet werden, wenn beide Connexine eliminiert sind. Die Generierung von Cx37 und Cx40 Doppelknockout-Mäusen bestätigte diese Hypothese. Diese Tiere sind aufgrund schwerer vaskulärer Abnormalitäten nicht lebensfähig und sterben kurz nach der Geburt (97). Sie leiden an lokalisierten Blutungen in Haut, Testes, Gastrointestinaltrakt und Lungen mit ausgeprägter Gefäßdilatation. Endotheliale Kommunikationsprozesse über gap junctions scheinen also essentiell für die Entwicklung des Gefäßsystems der Maus zu sein. Auch Cx43^{-/-}-Mäuse sterben perinatal durch eine gestörte Entwicklung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (82). Deletion von Cx45 im Mausmodell führt durch kardiovaskuläre Fehlbildungen (gestörte Ausbildung der Dottersack-Gefäße, abnormale Vaskularisierung der Plazenta, Störung der Rekrutierung glatter Muskelzellen um große Arterien, gestörte Herzentwicklung) zum Tod noch in utero (52, 55).

Gap junctions können sowohl zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen (heterozellulär) als auch zwischen den jeweiligen Zelltypen (homozellulär) ausgebildet werden (15). Der longitudinale (homozelluläre) Kommunikationsweg gibt die Möglichkeit, zelluläres Verhalten entlang des Gefäßbaumes zu synchronisieren. Signale breiten sich auf diesem Wege entlang der Endothel- oder glatten Muskelzellen aus und ermöglichen so dem Gefäß, als eine Einheit zu reagieren, was zu einer Konstriktion oder Dilatation über lange Strecken führen kann (22, 26). Terminale Arteriolen werden entsprechend dem lokalen Bedarf durch lokalchemische Einflüsse und Metabolite dilatiert. Allerdings sind nur sie diesem direkten Einfluss von Metaboliten durch Diffusion zugänglich. Um die vollen Durchblutungsreserven auszuschöpfen, ist aber auch eine Dilatation der vorgeschalteten, größeren Arterien notwendig. Der Prozess elektrotonisch weitergeleiteter Änderungen des Membranpotentials wird als „conducted dilation“ (weitergeleitete Vasodilatation) bezeichnet (42). In Cx40-defizienten Mäusen ist die conducted dilation in Reaktion auf Acetylcholin und Bradykinin gestört (16), was auf eine besondere Bedeutung von Cx40 für diesen Prozess hinweist. Generell scheint Cx40 eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung funktioneller Gefäßnetzwerke zu innehaben, denn in Cx40-defizienten Mäusen wurde arterielle Hypertonie festgestellt, die durch irreguläre Vasokonstriktionen von Arteriolen, die bis zu einem temporär vollständigen Verschluss einzelner Gefäße führen, verursacht wird (17).

Die myoendothelialen (heterozellulären) Verbindungen bilden einen transversalen Kommunikationsweg, durch den Endothelzellen beispielsweise den Tonus der anliegenden glatten Muskelzellen verändern können (27, 36). Chronische Veränderungen des Tonus glatter Muskelzellen führen zu strukturellen Veränderungen in der Gefäßwand (2). Dies lässt vermuten, dass intravaskuläre Kommunikation auch für die strukturelle Adaptation von Gefäßnetzen von Bedeutung ist. Diese Vermutung wird durch ein mathematisches Modell gestützt, welches Gefäßveränderungen als Reaktion auf hämodynamische und metabolische Stimuli simuliert (79, 80, 81). Hier konnte eine essentielle Rolle intravaskulärer Kommunikation in der Prävention der Ausbildung arteriovenöser Shunts nachgewiesen werden (Abb. 24): Ohne angioadaptive Mechanismen kommt es zu einer zufälligen Verteilung der Gefäßdurchmesser, die zu einer ineffizienten Blutversorgung führt (A). „Outward remodelling“ der Gefäßwand als Reaktion auf erhöhte Schubspannung koordiniert Gefäßdurchmesser entlang eines Strömungspfadens und führt so zu Gefäßhierarchie

(B). „Inward remodelling“ als Reaktion auf erhöhten Druck führt dazu, dass Arteriolen kleinere Durchmesser entwickeln als korrespondierende Venolen (arteriovenöse Asymmetrie) (C). Reaktionen gegenüber metabolischen Stimuli führen zu einer Aufrechterhaltung paralleler Strömungspfade (D). Informationstransfer von kleinen Segmenten zu den vorgeschalteten größeren Segmenten ist notwendig, um eine balancierte Strömung zwischen langen und kurzen Wegen aufrechtzuerhalten und die Ausbildung arteriovenöser Shunts zu verhindern (E). Adaptation als Reaktion allein auf hämodynamische Parameter ist nicht stabil, da es eine positive Rückkopplung zwischen Blutströmung und Gefäßdurchmesser gibt. Das Gefäßnetzwerk würde sich in einen einzelnen Strömungsweg umwandeln (*).

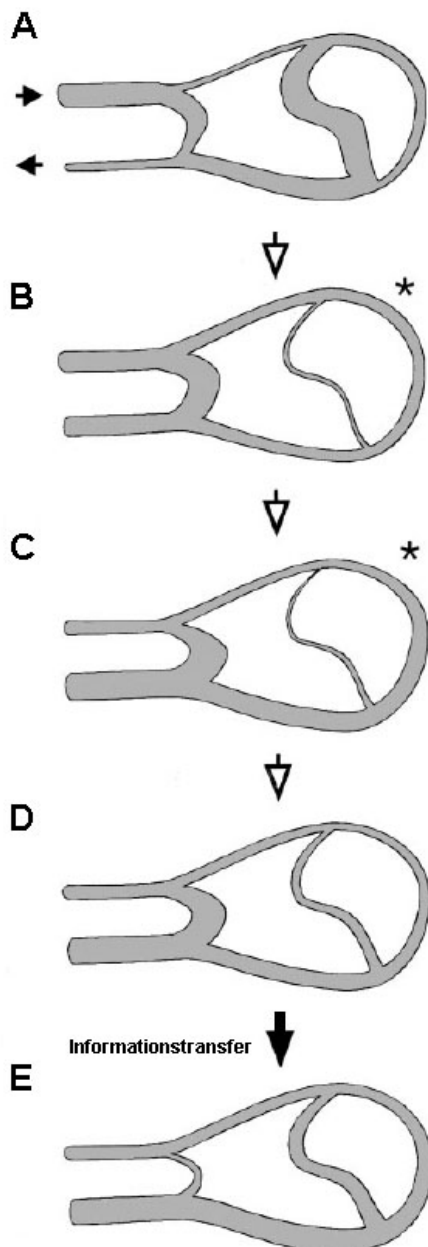


Abbildung 24:

Schematische Darstellung der Bedeutung angioadaptiver Reaktionen gegenüber verschiedenen Stimuli für die Gefäßnetzwerkarchitektur (nach (79)).

(A) ohne angioadaptive Mechanismen

(B) „Outward remodelling“ der Gefäßwand als Reaktion auf erhöhte Schubspannung

(C) „Inward remodelling“ der Gefäßwand als Reaktion auf erhöhten Druck

(D) Reaktion gegenüber metabolischen Stimuli

(E) Informationstransfer von kleinen Segmenten zu den vorgeschalteten größeren Segmenten

*: instabiles Gefäßnetzwerk

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Ausbildung eines hierarchischen Gefäßnetzwerks ist Folge eines komplexen Wechselspiels zwischen genetischen Faktoren und epigenetischen Faktoren wie Oxygenierung und Hämodynamik. Die Differenzierung von Gefäßen in Arterien und Venen wurde anfänglich ausschließlich für ein Resultat hämodynamischer Kräfte gehalten. Diese Theorie wurde in Frage gestellt, da endotheliale Vorläuferzellen schon vor ihrer Zusammenlagerung zu primären Gefäßnetzwerken und dem Beginn der Blutströmung arteriell und venös spezifische Gene exprimieren. Die Identifikation dieser Gene und die Aufklärung ihrer gefäßspezifischen Funktion sind für ein tieferes Verständnis der Gefäßentwicklung von essentieller Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Fragen, ob 1) das Expressionsmuster der vaskulär exprimierten Connexine 37, 40 und 43 in der Embryonalentwicklung spezifisch für Gefäße des arteriellen oder venösen Gefäßbaums ist, 2) die Expression von Cx40 durch epigenetische Faktoren (Sauerstoff, Blutströmung) reguliert wird, 3) hämodynamische Parameter existieren, die für embryonale Arterien und Venen *in vivo* charakteristisch sind und so zu einer selektiven Expression von Genen führen könnten und 4) Connexine in embryonalen Gefäßnetzwerken eine spezifische Funktion ausüben.

Methoden: Es wurden *in situ* Hybridisierungen gegen Cx37, 40 und 43 an ganzen Hühnerembryonen (whole-mount) und den sie umgebenden Dottersäcken durchgeführt. Die Regulation der Connexin-Expression wurde in Interventionsmodellen untersucht. Dabei wurden Hühnerembryonen chronisch hypoxischen und hyperoxischen Bedingungen ausgesetzt. Durch Ligatur einer zentral gelegenen Arterie wurde die Blutströmung in den extraembryonalen Membranen moduliert. Anschließend wurden Effekte auf die Connexin-Expression mittels *in situ* Hybridisierung und real-time PCR ermittelt. Spezifische hämodynamische Bedingungen in Arterien und Venen *in vivo* wurden durch intravitalmikroskopische Aufnahme des Dottersack-Kreislaufes analysiert. Die Funktion vaskulärer Connexine wurde durch Applikation des Connexin-Hemmers Carbenoxolon auf die Gefäße der Chorioallantoismembran (CAM) sowie durch Analyse Isolectin B4-gefärbter retinaler Gefäßbetten Cx40-defizienter Mäuse untersucht.

Ergebnisse: Es konnte für alle drei untersuchten Connexine eine Expression im Gefäßplexus des Dottersackes nachgewiesen werden. Die Expression von Cx43 war in venösen und arteriellen Gefäßen lokalisiert. Cx37 und Cx40 wiesen ein arteriell spezifisches Expressionsmuster auf. Während die Expression von Cx37 auf größere arterielle Gefäße beschränkt blieb, war Cx40 in Arterien der gesamten Dottersackzirkulation detektierbar. Die Expression von Cx40 im Gefäßsystem des Dottersackes war mittels *in situ* Hybridisierung ab dem Beginn der embryonalen Herzaktion nachweisbar und nahm bis zum dritten Entwicklungstag zu. In 12% und 70% O₂ inkubierte Hühnerembryonen wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Cx40 auf. Ligatur einer zentral gelegenen Arterie des Dottersackes führte zu einer Verminderung der Cx40-Expression um den Faktor 4.

In vivo waren deutliche hämodynamische Unterschiede zwischen den arteriellen und venösen Gefäßen der Dottersackzirkulation nachweisbar. Die durchschnittliche axiale Blutströmungsgeschwindigkeit war in Venen mit $(1120 \pm 882) \mu\text{m/s}$ höher als in Arterien $((360 \pm 209) \mu\text{m/s})$. Auch die mittlere Pseudo-Scherrate war in Venen deutlich höher $((12,15 \pm 8,94) \text{ s}^{-1})$ vs. $(4,84 \pm 2,16) \text{ s}^{-1}$. 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 $(0,007 \pm 0,02) \text{ s}^{-1}$).

Applikation von Carbenoxolon auf die Gefäße der Chorioallantois-Membran hatte eine Schrumpfung arterieller Gefäße zur Folge, die letztendlich zur Ausbildung einer avaskulären Zone führte. Venen waren an der Akutreaktion nicht beteiligt. Gefäßnetzwerke Cx40-defizienter Mäuse wiesen eine signifikant geminderte Gefäßdichte und eine signifikant geringere Anzahl von Verzweigungspunkten auf.

Fazit: Cx40 ist ein guter Marker für Arterien. Es ist anzunehmen, dass die Expression von Cx40 in Blutgefäßen nicht durch Sauerstoff, wohl aber durch hämodynamische Parameter reguliert wird. Die charakteristischen Unterschiede zwischen Arterien und Venen der Dottersackzirkulation sind 1) die Pulsatilität der Blutströmung (ausgedrückt durch relative Amplitude und relative Maximalbeschleunigung) und 2) die

Geschwindigkeit (und die daraus resultierende Scherrate). Die höchste Trennschärfe dieser Parameter hat die relative Maximalbeschleunigung. Kombination der relativen Maximalbeschleunigung und der mittleren Pseudo-Scherrate in Form eines Quotienten, des Pulse Slope Index (PSI), optimiert die Separation von arteriellen und venösen hämodynamischen Eigenschaften. Die beobachteten Unterschiede könnten der arteriell-spezifischen Expression von Cx40 zugrunde liegen. Da Effekte einer Connexin-Blockade zuerst in Arterien stattfinden, scheinen Connexine eine spezifische Rolle in diesen Gefäßen auszuüben. Auch die gestörte retinale Gefäßnetzwerkstruktur Cx40-defizienter Mäuse weist auf eine zentrale Bedeutung von Cx40 für die Entwicklung von Gefäßnetzwerken hin.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
a.u.	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
Cx	Connexin
DNA	desoxyribonucleic acid
E1, E2, E3	embryonaler Entwicklungstag 1, 2 und 3
mRNA	messenger ribonucleic acid
NO	nitric oxide
PBS	phosphate-buffered saline
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
ü. N.	über Nacht
z. B.	zum Beispiel

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999; 13(3):295-306.
- (2) Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, et al. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res* 2002; 39(1):12-20.
- (3) Berk BC, Min W, Yan C, et al. Atheroprotective Mechanisms Activated by Fluid Shear Stress in Endothelial Cells. *Drug News Perspect* 2002; 15(3):133-139.
- (4) Bongrazio M, Baumann C, Zakrzewicz A, et al. Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress. *Cardiovasc Res* 2000; 47(2):384-393.
- (5) Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics* 2002; 9(1):27-41.
- (6) Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004; 231(3):474-488.
- (7) Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438(7070):932-936.
- (8) Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005; 436(7048):193-200.
- (9) Chapman WB. The effect of the heart-beat upon the development of the vascular system in the chick. *Am J Anat* 1918; 23:175-203.
- (10) Cirotto C, Arangi I. How do avian embryos breathe? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. *Comp Biochem Physiol A* 1989; 94(4):607-613.
- (11) Cleaver O, Tonissen KF, Saha MS, et al. Neovascularization of the *Xenopus* embryo. *Dev Dyn* 1997; 210(1):66-77.
- (12) Davies PF. Haemodynamic influences on vascular remodelling. *Transpl Immunol* 1997; 5(4):243-245.
- (13) Davies PF, Tripathi SC. Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ Res* 1993; 72(2):239-245.
- (14) de Wit C. Connexins pave the way for vascular communication. *News Physiol Sci* 2004; 19:148-153.

- (15) de Wit C, Hoepfl B, Wolfle SE. Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions. *Biol Chem* 2006; 387(1):3-9.
- (16) de Wit C, Roos F, Bolz SS, et al. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* 2000; 86(6):649-655.
- (17) de Wit C, Roos F, Bolz SS, et al. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 2003; 13(2):169-177.
- (18) DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, et al. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvasc Res* 1989; 38(2):136-147.
- (19) Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr., et al. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 1981; 103(3):177-185.
- (20) Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 1989; 243(4897):1483-1485.
- (21) Dorrell MI, Friedlander M. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25(3):277-295.
- (22) Doyle MP, Duling BR. Acetylcholine induces conducted vasodilation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 2):H1364-H1371.
- (23) Dunn BE, Graves JS, Fitzharris TP. Active calcium transport in the chick chorioallantoic membrane requires interaction with the shell membranes and/or shell calcium. *Dev Biol* 1981; 88(2):259-268.
- (24) Duval M. *Atlas d' Embryologie*. Paris: G Masson, 1889.
- (25) Eichmann A, Yuan L, Moyon D, et al. Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Int J Dev Biol* 2005; 49(2-3):259-267.
- (26) Emerson GG, Segal SS. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ Res* 2000; 87(6):474-479.
- (27) Emerson GG, Segal SS. Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(1):H160-H167.
- (28) Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Connexins: gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19:277-284.

- (29) Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21:309-345.
- (30) Foo SS, Turner CJ, Adams S, et al. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 2006; 124(1):161-173.
- (31) Fouquet B, Weinstein BM, Serluca FC, et al. Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Dev Biol* 1997; 183(1):37-48.
- (32) Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, et al. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(8):4478-4485.
- (33) Garin G, Berk BC. Flow-mediated signaling modulates endothelial cell phenotype. *Endothelium* 2006; 13(6):375-384.
- (34) Gerety SS, Anderson DJ. Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 2002; 129(6):1397-1410.
- (35) Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, et al. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902:230-239.
- (36) Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol* 2004; 141(6):881-903.
- (37) Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, et al. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 2003; 5(1):45-57.
- (38) He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90(4):739-751.
- (39) Helbling PM, Saulnier DM, Brandli AW. The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 2000; 127(2):269-278.
- (40) Herzog Y, Guttman-Raviv N, Neufeld G. Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Dev Dyn* 2005; 232(4):1047-1055.
- (41) Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, et al. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* 2001; 109(1):115-119.
- (42) Hilton SM. A peripheral arterial conducting mechanism underlying dilatation of the femoral artery and concerned in functional vasodilatation in skeletal muscle. *J Physiol* 1959; 149:93-111.
- (43) Hirashima M, Suda T. Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis. *Endothelium* 2006; 13(2):137-145.

- (44) Jones EA, Baron MH, Fraser SE, et al. Measuring hemodynamic changes during mammalian development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(4):H1561-H1569.
- (45) Jones EA, Le Noble F, Eichmann A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:388-395.
- (46) Joutel A, Corpechot C, Ducros A, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; 383(6602):707-710.
- (47) Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126(21):4895-4902.
- (48) Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, et al. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 1998; 8(5):299-302.
- (49) Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, et al. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995; 121(12):4309-4318.
- (50) Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, et al. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 1977; 35(3):347-356.
- (51) Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997; 90(4):753-762.
- (52) Kruger O, Plum A, Kim JS, et al. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 2000; 127(19):4179-4193.
- (53) Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(5):145-151.
- (54) Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(7):475-486.
- (55) Kumai M, Nishii K, Nakamura K, et al. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 2000; 127(16):3501-3512.
- (56) Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 2001; 294(5542):564-567.
- (57) Lammert E, Cleaver O, Melton D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mech Dev* 2003; 120(1):59-64.
- (58) Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986; 231(4736):405-407.

- (59) Lawson ND, Scheer N, Pham VN, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001; 128(19):3675-3683.
- (60) Le Noble F, Fleury V, Pries A, et al. Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: go with the flow. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3):619-628.
- (61) Le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, et al. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 2004; 131(2):361-375.
- (62) Lehoux S, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech* 2003; 36(5):631-643.
- (63) Li L, Krantz ID, Deng Y, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 1997; 16(3):243-251.
- (64) Lillie F. *Lillie's Development of the Chick*. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1951.
- (65) Lindert J, Werner J, Redlin M, et al. OPS imaging of human microcirculation: a short technical report. *J Vasc Res* 2002; 39(4):368-372.
- (66) Lu X, Le Noble F, Yuan L, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 2004; 432(7014):179-186.
- (67) Lucitti JL, Jones EA, Huang C, et al. Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development* 2007; 134(18):3317-3326.
- (68) McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, et al. DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):8955-8960.
- (69) Metcalfe J, Stock MK. Current topic: oxygen exchange in the chorioallantoic membrane, avian homologue of the mammalian placenta. *Placenta* 1993; 14(6):605-613.
- (70) Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, et al. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 2001; 128(17):3359-3370.
- (71) Mukoyama YS, Shin D, Britsch S, et al. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 2002; 109(6):693-705.
- (72) Neufeld G, Cohen T, Shruga N, et al. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12(1):13-19.

- (73) Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 1997; 16(3):235-242.
- (74) Osborn EA, Rabodzey A, Dewey CF, Jr., et al. Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(2):C444-C452.
- (75) Papadaki M, Eskin SG. Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol Prog* 1997; 13(3):209-221.
- (76) Patten BM. *Early Embryology of the Chick*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1957.
- (77) Pelster B, Burggren WW. Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebra fish (*Danio rerio*). *Circ Res* 1996; 79(2):358-362.
- (78) Pries AR. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988; 7(4):327-345.
- (79) Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Structural adaptation of microvascular networks: functional roles of adaptive responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(3):H1015-H1025.
- (80) Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Structural response of microcirculatory networks to changes in demand: information transfer by shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(6):H2204-H2212.
- (81) Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Structural adaptation and stability of microvascular networks: theory and simulations. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2):H349-H360.
- (82) Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 1995; 267(5205):1831-1834.
- (83) Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81(3):177-199.
- (84) Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec* 2001; 264(4):317-324.
- (85) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626):671-674.
- (86) Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:73-91.
- (87) Rizzo V, Kim D, Duran WN, et al. Differentiation of the microvascular endothelium during early angiogenesis and respiratory onset in the chick chorioallantoic membrane. *Tissue Cell* 1995; 27(2):159-166.

- (88) Romanoff AL. *The Avian Embryo*. New York: The Macmillan Company, 1960.
- (89) Rossant J, Hirashima M. Vascular development and patterning: making the right choices. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(4):408-412.
- (90) Sabin FR. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11(1):5-7.
- (91) Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:551-571.
- (92) Segal SS, Duling BR. Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science* 1986; 234(4778):868-870.
- (93) Shin D, Anderson DJ. Isolation of arterial-specific genes by subtractive hybridization reveals molecular heterogeneity among arterial endothelial cells. *Dev Dyn* 2005; 233(4):1589-1604.
- (94) Shutter JR, Scully S, Fan W, et al. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* 2000; 14(11):1313-1318.
- (95) Simon AM, Goodenough DA, Li E, et al. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385(6616):525-529.
- (96) Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol* 1998; 8(5):295-298.
- (97) Simon AM, McWhorter AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol* 2002; 251(2):206-220.
- (98) Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004; 62(2):228-232.
- (99) Stephan F. Contribution expérimentale à l'étude du développement du système circulatoire chez l'embryon de poulet. L.P.U.d.France. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*. Paris: 1952: 218-310.
- (100) Storgard C, Mikolon D, Stupack DG. Angiogenesis assays in the chick CAM. *Methods Mol Biol* 2005; 294:123-136.
- (101) Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3657-3662.
- (102) Thoma R. *Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems*. Stuttgart: Ferdinand Enke, 1893.

- (103) Topper JN, Gimbrone MA, Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 1999; 5(1):40-46.
- (104) Villa N, Walker L, Lindsell CE, et al. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 2001; 108(1-2):161-164.
- (105) Wakimoto K, Kobayashi K, Kuro O, et al. Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem* 2000; 275(47):36991-36998.
- (106) Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93(5):741-753.
- (107) Weinstein BM. What guides early embryonic blood vessel formation? *Dev Dyn* 1999; 215(1):2-11.
- (108) Wheatley SC, Isacke CM, Crossley PH. Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development* 1993; 119(2):295-306.
- (109) You LR, Lin FJ, Lee CT, et al. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* 2005; 435(7038):98-104.
- (110) Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002; 129(20):4797-4806.
- (111) Zhong TP, Childs S, Leu JP, et al. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 2001; 414(6860):216-220.

8. ERKLÄRUNG

Ich, Lena Ulm, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Kontrolle arteriovenöser Differenzierung durch Sauerstoff und Blutströmung: Bedeutung der Expression, Regulation und Funktion von Connexinen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

15.04.2008

Lena Ulm

9. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Pries danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. le Noble sei für die lehrreiche Zeit am MDC gedankt. Sie wird mir immer im Gedächtnis bleiben.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Physiologie und des MDC, die mir im Labor zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Brinkmann, der mich „Mediziner im Labor“ labortauglich gemacht hat.

Bei Herrn Prof. Dr. de Wit bedanke ich mich für die faszinierende Möglichkeit, den Effekt einer Cx40-Deletion in einem genetischen Modell zu untersuchen. Herrn Dr. Hurtado danke ich für die Überlassung der Cx40-Sonde, die meine molekularbiologischen Anfänge im Labor sehr erleichtert hat.

Herrn Prof. Dr. Kübler danke ich für seine langjährige Unterstützung.

Herzlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Ohne euren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.