

Aus dem Institut für Physiologische Chemie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(komm. Direktor: Prof. Dr. M. Hatzfeld)

**Entwicklung eines geeigneten Modells zur  
Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens – Das  
Chorioallantoismembran (CAM) -Modell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Matthias Schüller**

geboren am 06.01.1976 in Oelsnitz/Vogtl.

Betreuer: PD Dr. U. Rothe

Gutachter:

1. PD Dr. U. Rothe
2. Prof. Dr. H.-G. Schaller
3. Prof. Dr. G. Bendas (Bonn)

05.04.05

14.09.05

**urn:nbn:de:gbv:3-000009039**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009039>]

für meine Eltern und Großeltern

## Referat

Die Selektine gehören zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und spielen im Entzündungsprozeß eine bedeutende Rolle. Sie sind Teil der Adhäsionskaskade, bei der es zu einer rollenden und verlangsamten Bewegung der Leukozyten am Gefäßendothel und schließlich zu deren Extravasation in das entzündete Gewebe kommt. Zur Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen sollte ein einfaches in vivo Modell entwickelt werden, welches sich zur lichtmikroskopischen Betrachtung sowie zur Injektion von Objekten und deren Geschwindigkeitsbestimmungen eignet. Die CAM (Chorio-Allantois-Membran) des Hühnerembryos erwies sich dafür als gut geeignet. Ein umfassender Literaturteil gibt einen Überblick des aktuellen Wissensstandes über die CAM. Er dient als Zusammenfassung der zahlreichen Literatur und bildet für alle weiterführenden Experimente das Grundwissen. Zur Darstellung des Blutkreislaufes und zur Entwicklung der Injektionsmethoden wurden FITC-Partikel (Fluoreszierende Carboxylierte Mikropartikel) benutzt. Für die Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung wurden CHO-Zellen (Chinesische Hamste ovar-zellen), CHOE-Zellen (+E-Selektin), t-CHO-Zellen, t-CHOE-Zellen, U937-Zellen sowie beschichtete Partikel (P-Selektin, BSA – Bovines Serum Albumin) verwendet. Durch Transfektion mit GFP (Grün fluoreszierendes Protein) respektive Behandlung mit Calcein-AM-Ester™ fluoreszierten die Zellen unter UV-Licht. Es gelang die Injektion aller genannten Objekte. Beim intravasalen Verhalten zeigten die CHO- und die U937-Zellen eine so starke Adhäsion am Gefäßendothel, daß differenzierte Geschwindigkeitsbestimmungen unmöglich waren. Zum Zwecke des direkten Vergleichs wurden die Geschwindigkeiten der beschichteten Partikel in den Blutgefäßen von der 0. bis zur 4. Gefäßordnung am 7., 10. und 17. Entwicklungstag gemessen. Statistisch signifikant langsamere Geschwindigkeiten der mit P-Selektin beschichteten Partikel wurden am 7. Tag in der 0. Ordnung ( $p=0,031$ ), am 10. Tag in der 2. Ordnung ( $p=0,027$ ) und am 17. Tag in allen Ordnungen ( $p<0,05$ ) gemessen. Der größte, hochsignifikanteste Unterschied war am 17. Tag in der 2. Ordnung ( $p<0,001$ ) festzustellen. Letztendlich konnten mit dem entwickelten in vivo Modell hühnereigene Leukozyten injiziert werden. Die anschließende in vivo Mikroskopie zeigte, daß sich diese Zellen ebenfalls zu Geschwindigkeitsanalysen eignen.

*Schüller, Matthias: Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens – Das Chorioallantoismembran (CAM) -Modell. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2005*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Selektine.....	1
1.1.1	Die Adhäsionskaskade.....	1
1.1.2	Einteilung und Aufbau der Selektine.....	1
1.1.3	Selektinliganden.....	2
1.1.4	Überexpression, Defekte.....	3
1.1.5	Therapieansätze.....	4
1.2	Das Chorioallantoismembran (CAM) -in vivo Modell.....	4
1.3	Voraussetzungen und Zielstellungen.....	5
<b>2</b>	<b>Die Chorioallantoismembran (CAM) .....</b>	<b>7</b>
2.1	Physiologische Bedeutung der CAM.....	7
2.2	Entstehung der CAM.....	7
2.2.1	Chorion und Amnion.....	7
2.2.2	Allantois.....	8
2.2.3	Bildung der CAM.....	9
2.3	Blutfluß.....	10
2.4	Bedeutung des CAM-Modells.....	13
2.5	Gefäßentwicklung bei Schalen- und schalenloser Kultivierung.....	14
2.6	Vaskularisation der CAM.....	14
2.6.1	Vaskulo- und Angiogenese.....	14
2.6.2	Embryonale Vaskulogenese.....	15
2.6.3	Postnatale Vaskulogenese.....	16
2.6.4	Angiogenese.....	16
2.6.5	Endothel der CAM.....	17
2.7	Blutbildung.....	17
2.8	Blutzellen.....	21
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1	Eier und Materialien.....	24
3.2	Brutschrank.....	24
3.3	Kultivierungsmethoden.....	25
3.3.1	In ovo Kultur, einfach gefenstert.....	25
3.3.2	In ovo Kultur, doppelt gefenstert.....	25
3.3.3	„Spiegeleikultur“.....	25
3.4	Injektion.....	26
3.4.1	Injektionssubstanzen.....	26
3.4.2	Herstellung der Injektionssubstanzen.....	26
3.4.3	Kanülenherstellung.....	28
3.5	Injektionstechnik.....	30
3.6	Makroinjektion.....	31
3.7	Fotos.....	32
3.8	Videomikroskopie.....	32
3.9	Auswertung Injektion.....	33

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
4.1	Kultivierung .....	34
4.2	Injektion von CHO-, CHO-E- und U 937-Zellen .....	34
4.3	Injektion und Vergleich der beschichteten Partikel .....	35
4.4	Injektion von hühnereigenen Leukozyten.....	40
4.5	Fotoserie.....	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
5.1	Kultivierungsmethoden.....	41
5.2	Induktion von Entzündungen .....	43
5.3	Injektionstechnik.....	43
5.3.1	Mikro- / Makroinjektion .....	43
5.3.2	Kanülenherstellung .....	44
5.4	Injektion von Objekten .....	45
5.4.1	Injektion von Fluoreszenzpartikeln.....	45
5.4.2	Injektion von CHO/ CHO-E Zellen.....	45
5.4.3	Injektion von U 937-Zellen .....	47
5.4.4	Injektion beschichteter Partikel.....	47
5.4.5	Injektion hühnereigener Leukozyten .....	48
5.5	Auswertung .....	48
5.5.1	Videoauswertung .....	48
5.5.2	Möglichkeiten des Vergleiches.....	49
5.6	Diskussion der Durchflußgeschwindigkeit.....	50
5.6.1	Vergleich zwischen P-Selektin und BSA - beschichteter Partikel .....	50
5.7	Eignung des Huhns als in vivo Modell für selektinvermittelte Leukozytenadhäsion .....	54
5.8	Fotoatlas .....	55
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Anhang (Tabellen, Diagramme und Fotoatlas)</b> .....	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Thesen</b> .....	<b>79</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

BSA	Bovines Serumalbumin
CABF	Chorioallantois-Blutfluß
Calcein-AM-Ester™	Calcein-Acetoxymethyl-Ester
CAM	Chorio-Allantois-Membran
CHO-Zellen	chinesische Hamsterovazellen
d	Tag
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin
EDC	Ethyl-Dimethylaminiopropyl-Carbodiimid
EGFP	E-Selektin und grün fluoreszierendes Protein
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (Fibroblast-Growth-Factor)
FITC	Fluoresbrite Carboxy Microspheres (fluoreszierende carboxylierte Mikropartikel)
FKS	fetales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IL – 1	Interleukin – 1
IMG	einstülpendes mikrovaskuläres Wachstum
LPS	Lipopolysaccharide
Milli-Q	doppelt destilliertes Wasser
m-RNS	Botenribonukleinsäure
NFκB	Transkriptionsfaktor κB
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
sLe <sup>x</sup>	Sialyl Lewis <sup>x</sup>
t-CHO-Zellen	transfektionierte chinesische Hamsterovazellen
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
U 937-Zellen	menschliche Myelomzellen
VEGF-Rezeptor KDR/flk-1	Ein spezieller VEGF-Rezeptor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

## **1 Einleitung**

### **1.1 Die Selektine**

#### **1.1.1 Die Adhäsionskaskade**

Selektine sind Kohlenhydrat bindende Adhäsionsmoleküle, welche im Prozeß der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. Zur Abwehr lokaler Entzündungen müssen phagozytierende Leukozyten aus dem fließenden Blut in das betroffene Gewebe gelangen, um dort ihre zellulären Immunabwehrfunktionen ausüben zu können.

Die Extravasation findet hauptsächlich in den kleinen venösen Gefäßen (postkapilläre Venolen) statt. Voraussetzung ist eine initiale rezeptorgesteuerte Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel, welche als Adhäsionskaskade bezeichnet wird (Springer TA, 1995). Kommt es lokal zu einer Entzündung, wird die Adhäsionskaskade durch Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren in Gang gesetzt. Diese führen zu einer lokalen Vasodilatation (Thrombin, Histamin) sowie zu einer Expression von Adhäsionsrezeptoren auf den Endothelzellen (TNF $\alpha$  – Tumornekrose-Faktor  $\alpha$ , IL-1 – Interleukin1). Nach einem initialen Kontakt fließender Leukozyten im Blutstrom (ca. 2mm/s), dem Tethering, kommt es über Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu schwach affinen Bindungen am Gefäßendothel. Aufgrund der Scherkräfte in den Gefäßen kommt es zu einer rollenden Verlangsamung der Leukozyten entlang der Endothelzellen (ca. 20 $\mu$ m/s). Das Tethering und Rollen der Leukozyten wird durch die Rezeptorfamilie der Selektine vermittelt, auf deren Wirken die nachfolgenden Adhäsionsrezeptoren aus der Integrin- bzw. I<sub>S</sub>G-Superfamilie aufbauen (Bendas G, 1999).

Werden die verlangsamten und lokal konzentrierten Leukozyten durch endothelial freigesetzte Mediatoren, wie beispielsweise Chemokine oder den plättchenaggregierenden Faktor (PAF) aktiviert (Baggiolini et al., 1997; Zimmerman et al., 1997), exprimieren sie die Integrin-Rezeptoren, welche durch Bindung ihrer Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie die feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel und deren Emigration in das Gewebe vermitteln.

#### **1.1.2 Einteilung und Aufbau der Selektine**

Die Selektine besitzen eine ähnliche Struktur und werden entsprechend Ihrer Ursprungszellen in L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-Selektin (Plättchen und

## 1. Einleitung

Endothel) eingeteilt. Alle 3 Gruppen sind langgestreckte, membrangebundene Glykoproteine, welche aus 5 Domänen (Abb. 1) bestehen.

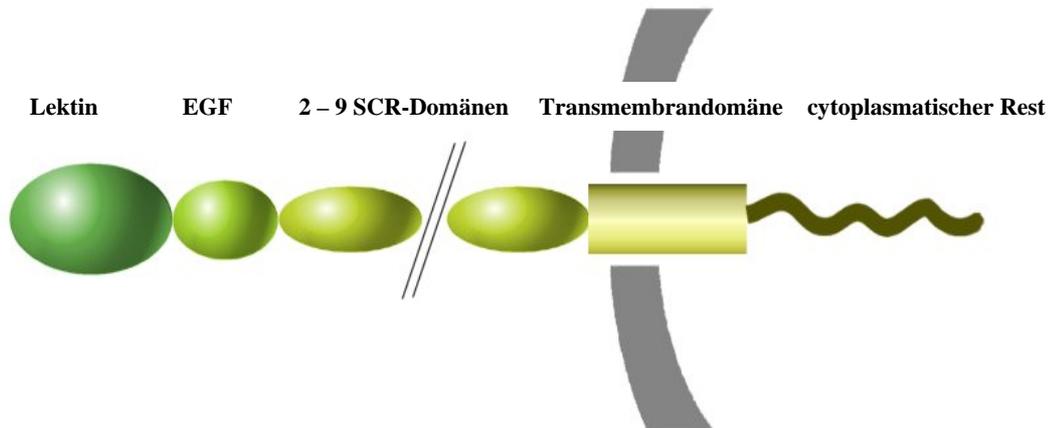


Abb.1: Die 5 Domänen der Selektine

Dem N-terminalen zytoplasmatischen Rest (17-35 Aminosäuren, je nach Typ) folgt eine 22 Aminosäuren lange Transmembrandomäne. Im Anschluß daran sorgt eine variable Anzahl von SCR's (short consensus repeats) für eine unterschiedliche Ausdehnung im extrazellulären Raum. Je nach Selektinart und den bisher untersuchten Spezies variiert die Anzahl der SCR's zwischen 2 und 9. Nach einer dem Epidermalen Wachstumsfaktor ähnlichen Domäne (EGF) folgt die eigentliche Kohlenhydrat-Bindungsstelle (Lektindomäne) am N-Terminus. Die einzelnen Selektine weisen eine große Sequenz-Homologie (etwa 65%) innerhalb der Lektindomänen auf (Huang et al., 1997).

Die Induktion der Selektinexpression durch verschiedene Entzündungsmediatoren reguliert Dauer und Intensität des Leukozytenrollens und ordnet den einzelnen Selektinen unterschiedliche Funktionen innerhalb des Rollprozesses zu. Das räumlich exponierte P-Selektin mit seiner langgestreckten Struktur vermittelt in Kombination mit dem L-Selektin das Rollen in der frühen Phase der Entzündung.

E-Selektin dagegen ist aufgrund seiner späteren Expression und seiner langsamen Bindungskinetik für die Überleitung zur festen Adhäsion der Leukozyten am Gefäßendothel verantwortlich.

### 1.1.3 Selektinliganden

Selektinliganden sind mucinähnliche Strukturen (langgestreckte Glykoproteine), an deren Serin oder Threonin reichen Proteingrundgerüst viele Kohlenhydrat-

## 1. Einleitung

seitenketten als die eigentlichen Bindungsepitope glykosidisch geknüpft sind. Die bekanntesten Liganden sind die L-Selektin-Liganden GlyCAM-1, CD 34 und MAdCAM-1, der P-Selektin-Ligand PSGL-1 sowie der E-Selektin-Ligand ESL-1. Herausragende Bedeutung als gemeinsames Bindungsepitop hat das Tetrasaccharid Sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>). Obwohl alle Selektine lösliches sLe<sup>x</sup> nur mit sehr geringer Affinität (etwa 1 mM) binden und bisher keine besser bindenden Kohlenhydrate gefunden wurden, steht aktuell eine hinreichende strukturelle Erklärung der hohen Bindungskräfte zu den natürlichen Mucinliganden (etwa 100 nM) aus. Individuelle Abweichungen bei den Ligandenstrukturen weisen jedoch auf Bindungsunterschiede hin. Die Theorie der multivalenten Bindung (lokale Anreicherung vieler einzelner Bindungsepitope) und die benachbarte Thyrosin-Phosphorylierung am Peptidgerüst sind bisher die beiden einzigen Erklärungsversuche für die ca. 100-fach stärkere Bindungsaffinität gegenüber der Einzelbindung.

### 1.1.4 Überexpression, Defekte

Eine lokal überschießende Ansammlung von Leukozyten im Gewebe kann zur Pathogenese von Entzündungen beitragen. Eine Dysregulation der Selektine wird bei entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder nach myokardialer Ischämie beobachtet und für die Entstehung dieser Krankheiten mitverantwortlich gemacht. Aber auch bei der Atherosklerose als entzündlich fibrotische Reaktion auf die Akkumulation von cholesterolreichen oxidierten Lipoproteinen in der Gefäßwand sowie bei diabetischen Gefäßschäden findet eine pathologische Überexpression von Selektinen statt (Bendas G, 1999). Außerdem wird eine Selektinbeteiligung bei der Metastasierung von Krebs diskutiert. Trotz individueller Unterschiede der Krebszellen konnte eine selektinvermittelte Bindung verschiedener metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel und die anschließende Gewebe-Invasion (Biancone et al., 1996) nachgewiesen werden. Es konnte in vitro und in vivo durch gezielte Blockade der Selektine gezeigt werden, daß die auf den Krebszellen vorkommenden glykosylierten Strukturen (sLe<sup>x</sup>, auch das Isomere sLe<sup>a</sup> – Sialyl Lewis<sup>a</sup>) dabei als Selektinliganden fungieren (Sato et al., 1997). Durch weiterführende Erforschung der Selektine könnten somit auch für viele auf dem Gebiet der Zahnheilkunde vorkommende Tumore (Plattenepithelkarzinom, Basaliom) neue diagnostische und therapeutische Optionen entwickelt werden.

## 1. Einleitung

Das LADS (Leukozyten Adhäsion Defizienz Syndrom) ist ein seltener angeborener, autosomal-rezessiv vererblicher Defekt der Adhäsionskaskade (Kugel et al., 2003). Während bei LAD Typ 1 die Integrinfamilie defekt ist, ist bei LAD Typ II das Selektinsystem betroffen (Etzioni und Tonetti, 2000). Neben verschiedenen wiederkehrenden bakteriellen Infektionen (Otitis media, Septikämie) geht das Syndrom mit einer sehr aggressiv verlaufenden Parodontitis einher. Trotz persistierender Leukozytose ist die Infektionsabwehr durch mangelnde Haftung der Leukozyten am Endothel und deren fehlende Einwanderung in das entzündete Gewebe (Meyle und Axmann, 1999) allgemein herabgesetzt.

### 1.1.5 Therapieansätze

Verantwortlich für die Exprimierung der vaskulären E- und P-Selektine im Entzündungsprozeß ist der Transkriptionsfaktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Verschiedene antiinflammatorische Medikamente wirken z.B. durch Hemmung oder Aktivierung des Inhibitors des NF $\kappa$ B. Einige Basisantirheumatika enthalten Goldverbindungen, welche die synoviale Expression von E-Selektin vermindern (Corkill et al., 1991).

Neuartige Ansätze in der antiinflammatorischen Therapie bietet auch der Gedanke, Arzneistoffvehikel durch Kopplung mit Selektinantikörpern direkt zum Ort der Entzündung zu bringen. Es konnte in vitro die gezielte Anreicherung von selektin-gerichteten Immunliposomen an Endothelzellen unter stimulierten Scherflußbedingungen (Bendas et al., 1998) erreicht werden. Durch den gezielten Transport und die Freisetzung von Pharmaka direkt im Entzündungsgebiet könnte die antiinflammatorische Therapie deutlich verbessert werden (Bendas G, 1999). Für die Zahnmedizin würde dies z.B. die Behandlung der chronischen Parodontitis marginalis superficialis und - profunda, der Parodontitis apicalis acuta und – chronica, aber auch chronische Schleimhautentzündungen wie die Lingua geographica (Landkartenzunge), effektiv verbessern. Auch für die Osteomyelitis des Kieferknochens könnten die neuen antiinflammatorischen Medikamente eingesetzt werden.

### 1.2 Das Chorioallantoismembran (CAM) -in vivo Modell

Da also ein großes Interesse seitens der Forschung als auch der Industrie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Selektinen und deren Rezeptoren, Hemmstoffen sowie Wirkungsverstärkungen vorliegt, sollte ein einfaches in vivo Modell entwickelt werden, welches möglichst vielen Ansprüchen genügt.

## 1. Einleitung

Am leichtesten zugänglich, billig in der Anschaffung und mit einer im Vergleich zu Mäusen unproblematischen Gesetzgebung ist das bebrütete Hühnerei.

Die CAM des Hühnerembryos ist als in vivo Modell schon seit längerer Zeit bekannt und gut untersucht. Es hat sich für viele in vivo Experimente und Studien (s.2. Teil: „Die CAM“) bereits bewährt. Literatur zu Untersuchungen der Selektin-Rezeptor-Wechselwirkung mittels des Hühnerembryos als in vivo Modell gibt es allerdings nicht. Das könnte daran liegen, daß es bis vor kurzer Zeit keine Hinweise auf die Existenz von Selektinen im Hühnerembryo gab. Da aber prinzipiell in Vogelorganismen, und somit auch in Gallus gallus, die gleichen physiologischen Vorgänge ablaufen wie in Säugerorganismen, kann man davon ausgehen, daß auch im Hühnerembryo Selektine vorkommen. Auch in Hühnern finden Entzündungsprozesse statt, die denen in Säugern entsprechen. Neuere Untersuchungen, welche nach Abschluß meiner Versuche im Jahre 2002 durchgeführt wurden, bestätigen ebenfalls das Vorhandensein von Selektinen im Hühnerembryo. So konnte mittels in situ Hybridisierung bereits im 9 d Embryo m-RNA von P-Selektin nachgewiesen werden (Plugge EM, 2004).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, das bereits bekannte CAM-Modellsystem des Hühnerembryos so weiterzuentwickeln, daß Injektionen mit selektinhaltigen Objekten durchgeführt und ausgewertet werden können. Dafür mußten eigene, neue Techniken entwickelt werden. Da die vorliegende Arbeit die Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen soll, wird im Literaturteil (2. Teil „Die CAM“) die CAM umfassend beschrieben. Dieser Überblick über die reichhaltige, in viele Richtungen ausgedehnte Literatur stellt die Basis für weiterführende Experimente.

### 1.3 Voraussetzungen und Zielstellungen

Zu Beginn stellte sich die Aufgabe, eine geeignete Kultivierungsmethode für die Hühnereier zu finden, welche folgende Anforderungen erfüllen sollte:

- leicht erlernbar
- hohe Überlebensraten der Embryos
- geringer Aufwand (personell, zeitlich, technisch und finanziell)
- Möglichkeit zur intravasalen Injektion und Beobachtung verschiedener Objekte

Im Institut wurde zwar mit Hühnereiern gearbeitet (einfach gefensterter in ovo Methode), jedoch konnte dieses Verfahren nicht für die Belange dieser Arbeit

## 1. Einleitung

angewendet werden. Die Methode ist ungeeignet wegen den schlechten Injektionsbedingungen v.a. bei älteren Embryos sowie der schlechten Übersicht über das Gefäßsystem. In der Literatur sind eine Reihe alternativer Methoden beschrieben (Narbaitz und Jande, 1978; Dunn und Fitzharris, 1979), jedoch stellte sich deren technische Durchführung schwieriger heraus als angenommen. Entweder waren die Überlebensraten der Embryos nicht akzeptabel (<15 % bis zum 10. Entwicklungstag), oder die Injektion der verschiedenen Substanzen erwies sich als unmöglich. So wurden zusätzlich Experimente mit der doppelt gefensterten in ovo Methode sowie mit der Spiegeleikulturmethode in den verschiedensten Variationen und Umgebungsbedingungen durchgeführt. Als brauchbar hat sich nur die „Spiegeleimethode“ (Auerbach et al., 1974; Schlatter et al., 1997) mit Waageschälchen als Behälter erwiesen. Die besten Überlebensraten wurden bei 37,5 °C, 78 % rel. Luftfeuchte und mit einer Konzentration von 1,5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank erreicht.

Zur Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens wurden entweder beschichtete Partikel oder Zellen injiziert. Deren Fluoreszenz konnte im Stereomikroskop beobachtet werden. Die von uns entwickelte Methode zur Auswertung und Geschwindigkeitsbestimmung lehnt sich an Meuer HJ, 1992, an, hat jedoch den Vorteil, ohne Software und PC auszukommen. Lediglich ein Videorekorder mit schrittweiser Bildwiedergabe wird benötigt.

Um die vorgesehenen Objekte (Partikel, Zellen) injizieren zu können, mußte auch eine neue Injektionstechnik entwickelt werden. Die vorhandenen (teueren) Mikroinjektionskanülen erwiesen sich als ungeeignet. Es wurde ein Verfahren entwickelt, die Kanülen selbst herzustellen und den jeweiligen Injektionsbedingungen (Injektionssubstanz, Injektionsort) anzupassen. Die anfallenden Kosten reduzierten sich durch die Verwendung einfacher Glasrohlinge als Ausgangsstoff enorm.

Wichtig für die erfolgreiche Injektion sind Injektionszeit, -art (Mikro-/Makroinjektion) und der Anstechwinkel der Gefäße. Diese Größen wurden für die verschiedenen Objekte optimiert. Zur Injektion mit den geeigneten Injektionswinkeln standen keine kommerziellen Geräte zur Verfügung. Deshalb mußte der Versuchsaufbau individualisiert und der Mikroinjektor umgebaut werden.

Außer den vorhanden technischen Geräten wie Stereomikroskop, Hi-Speed Kamera, PC u.ä., wurde die finanzielle Belastung gering gehalten. Somit ist das entwickelte System auch für die Forschung und die pharmazeutische Industrie von Interesse.

## **2 Die Chorioallantoismembran (CAM)**

### **2.1 Physiologische Bedeutung der CAM**

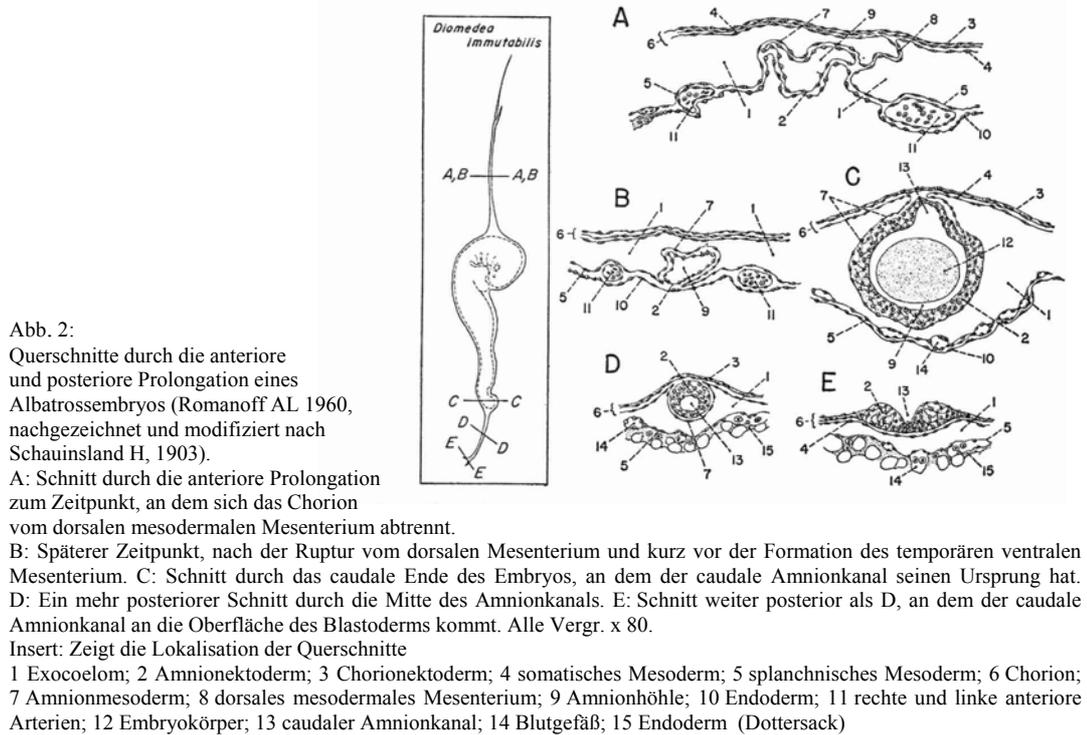
Die CAM dient dem Hühnerembryo in erster Hinsicht als Gasaustauschfläche (Rizzo und DeFouw, 1993; Bellairs und Osmond, 1997; Ausprunk et al., 1974; DeFouw DO, 1988; Tazawa H, 1978; Van Golde et al., 1996) ähnlich der Säugerplazenta oder den adulten Lungen, ist aber auch für den Kalziumtransport (Bellairs und Osmond, 1997) von der Schale in den Embryo verantwortlich. Während der ersten 10 Tage erhält der Embryo sein Kalzium vom Dottersack, aber die benötigte Menge steigt in den letzten 11 Tagen der Inkubation stark an, da die Knochen zu ossifizieren beginnen. Das Kalzium wird dann hauptsächlich von der Schale bereit gestellt (Kontakt zur CAM), welche dadurch bis zu 50% ihres Gewichtes verliert. Desweiteren ist die CAM ein Sammelbecken für stickstoffhaltige Endabbauprodukte, welche durch den Embryo produziert werden (Bellairs und Osmond, 1997).

### **2.2 Entstehung der CAM**

#### **2.2.1 Chorion und Amnion**

Das extraembryonale Ektoderm und die Somatopleura bilden die Amnionfalten, welche frühzeitig die Embryonalanlage in cranio-caudaler Richtung umfassen, in der dorsalen Mittellinie zusammenstoßen und 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 Keimling, während das Chorion das extraembryonale Cölom nach außen abschließt. Jede dieser beiden Hüllen besteht aus Epithel und Stützgewebe, wobei letzteres die Auskleidung des extraembryonalen Cölom bildet (Fitze-Gschwindt VD, 1973). Das Chorionepithel ist nach außen, das Amnionepithel nach innen gerichtet (Lille FR, 1952; Romanoff AL, 1960). Am Ende der 1. Inkubationswoche hat der größte Teil des Chorions Kontakt mit der Schalenhaut (Leighton J, 1967; McCormik et al., 1984; Knighton et al., 1977). Nach Ausbildung von Amnion und Chorion ist ein vollständiger Abschluß des Keimes von der Außenwelt erreicht (Lille FR, 1952; Romanoff AL, 1960).

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)



### 2.2.2 Allantois

In der Gegend des Nabels bildet sich nach 48 Stunden eine sackförmige Ausstülpung des Enddarmes, die Allantois oder der Harnsack, der auch die Ausscheidungen der embryonalen Nieren aufzunehmen hat (Abb. 3). Diese stößt in das Exocöl vor, wächst sehr rasch und erreicht zwischen dem 4. und 5. Bebrütungstag das Chorion. Als Derivat des embryonalen Darmes besteht sie aus einem Epithel, das wie die Dottersackwand von Stützgewebe überzogen ist.

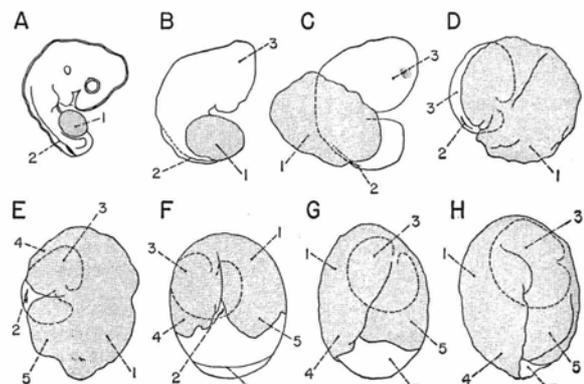


Abb. 3: Die Größenzunahme der Allantois im Hühnerembryo (Romanoff AL, 1960, nachgezeichnet und modifiziert nach Hirota S, 1894).

A: 78 h (x2,5); B: 104 h (x2,0); C: 5 Tage (x1,5);  
 D: 6 Tage (x1,0); E: 7 Tage (x0,5); F: 8 Tage (x0,5);  
 G: 9 Tage (x0,5); H: 10 Tage (x0,5)  
 1: Allantois; 2: seröse Amnionverbindung; 3: Amnionhöhle; 4: vorderer Allantoislappen; 5: hinterer Allantoislappen; 6: Sinus terminalis; 7: Eiweiß

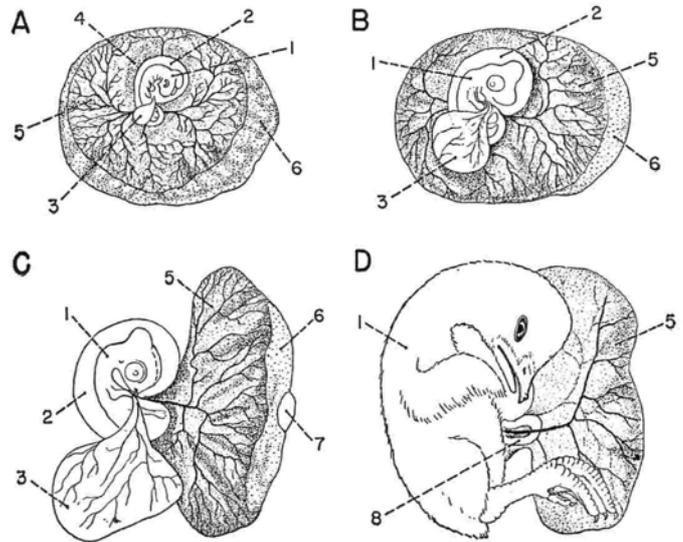
## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Abb. 4:

Der Dottersack des Hühnerembryos zu verschiedenen Stadien vom 4,5. bis zum 19. Tag. Nachgezeichnet und modifiziert nach Duval, 1889.

A: am Tag 5; B: Tag 6; C: Tag 7 (x0,66), nur zu sehen, wenn der Embryo von der Eierschale entfernt und in Wasser getaucht ist; D: Tag 19 (x0,66) Amnion und Allantois sind entfernt.

1: Embryo; 2: Amnionhöhle;  
3: Allantois; 4: Area pellucida; 5: Area vasculosa;  
6: Area vitellina;  
7: Dottersacknabel; 8: Darmschlinge



### 2.2.3 Bildung der CAM

Das Chorion- und Allantoisepithel, ehemals ektodermalen und endodermalen Ursprungs, sind zusammen mit dem vaskularisierten Stroma mesodermalen Ursprungs an der Formation der CAM beteiligt (Ribatti et al., 1999; s. Abb. 2). Die CAM entsteht durch Verschmelzung von Chorion und Allantois zwischen dem 4. und 5. Bebrütungstag (Rizzo et al., 1995; DeFouw DO, 1988). Dabei nimmt der Allantoissack stark an Volumen zu, und die einander zugewandten mesodermalen Oberflächen von Chorion und Allantois verschmelzen (Leighton J, 1967; McCormik et al., 1984; Knighton et al., 1977).

Die neugebildete CAM besteht demnach aus 3 Schichten: Dem Ektoderm (Chorion), Mesoderm (verschmolzenes somatisches Mesoderm vom Chorion und splanchnisches Mesoderm der Allantois) und dem Endoderm der Allantois (Bellairs und Osmond, 1997).

Im intakten Ei breiten sich die CAM und ihre Gefäße über die Oberfläche des Dottersackes aus und bedecken ihn am 6. oder 7. Tag komplett (Fuchs und Lindenbaum, 1988). Das reichliche Gefäßsystem, welches sich in der Mesodermis entwickelt, wird durch die paarigen Allantois (od. Nabel) -arterien und -venen versorgt (Bellairs und Osmond, 1997).

### 2.3 Blutfluß

Alle vom Herz wegführenden Gefäße werden als Arterien, alle zum Herz hinführenden Gefäße als Venen bezeichnet, unabhängig von deren Sauerstoffsättigungsgrad. Während die Arterien des Körperkreislaufes oxygeniertes Blut enthalten, führen die des Lungen- oder CAM-Kreislaufes deoxygeniertes Blut. Die großen Arterien teilen sich in immer kleiner werdende Arteriolen auf. Die kleinsten von Ihnen bezeichnet man als präkapilläre Gefäße, welche als Kapillargefäße enden, in denen der Großteil des Stoff- und Gas-

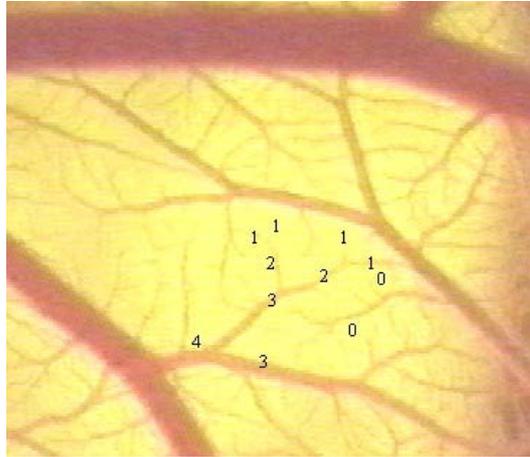


Abb. 5: Ausschnitt aus dem Gefäßsystem eines 12 Tage alten Hühnerembryos zur Demonstration der unterschiedlichen Gefäßordnungen.

Die Zahlen geben die Ordnung des jeweiligen Gefäßes an. 2 Gefäße der 1. Ordnung bilden ein Gefäß 2. Ordnung; 2 Gefäße der 2. Ordnung bilden ein Gefäß 3. Ordnung; usw., 0=Kapillargefäß  
(Eigene Aufnahme, Vergr. x16)

austausches stattfindet. Das nun wieder zum Herz hinfließende Blut gelangt über die postkapillären Gefäße (Venolen), welche sich zu immer größer werdenden Venen vereinigen, schließlich in die großen Hohlvenen und somit ins Herz zurück. Bei der Nomenklatur der unterschiedlich großen Arteriolen und Venolen wird sich dem Prinzip von Fenton und Zweifach, 1981; DeFouw et al., 1989, angeschlossen. Bei dieser Methode dienen die Kapillargefäße als Referenzpunkt der Zählweise. Die distalsten präkapillären und die proximalsten postkapillären Gefäße werden als Gefäße 1. Ordnung bezeichnet. Beim Zusammentreffen zweier Gefäße 1. Ordnung entsteht ein Gefäß 2. Ordnung. Genauso bilden 2 Gefäße 2. Ordnung ein Gefäß 3. Ordnung, usw. Für den Fall, daß zwei Gefäße unterschiedlicher Ordnung zusammenfließen, wird die höchste Ordnung beibehalten (s. Abb. 5).

Die Nabelarterien bringen  $\text{CO}_2$  und Stoffwechselendprodukte in die Allantois (nach Verschmelzung zur CAM  $\rightarrow$  in die CAM) und die Nabelvenen versorgen den Embryo mit oxygeniertem Blut (s. Abb. 6). Die CAM wird von der linken und rechten Chorioallantoisarterie versorgt, aber nur von einer Chorioallantoisvene drainiert (DeFouw DO, 1988).

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Abb. 6: Die extraembryonalen Strukturen und Zirkulationen im Hühnerembryo (Nachgezeichnet und modifiziert nach Patten BM, 1953). Über die Dotterarterie gelangt das Blut zum Eidotter und versorgt den Embryo über die Dottervene mit Nährstoffen. Die Nabelarterie transportiert die Stoffwechselabfälle zur Allantois und die Nabelvene bringt oxygeniertes Blut zum Embryo zurück. Die flüssigkeitsgefüllte Amnionhöhle dient als Schutzkammer für den Embryo.

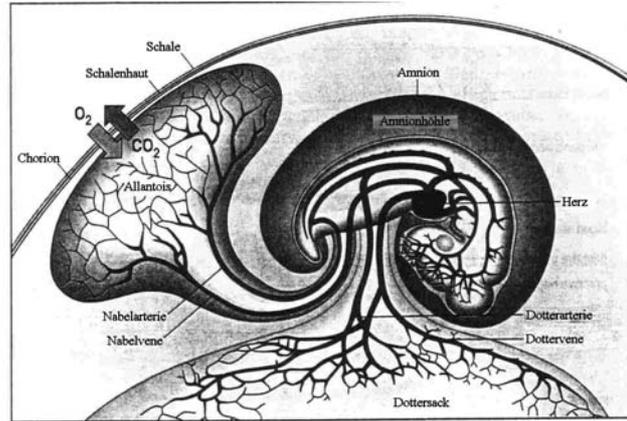
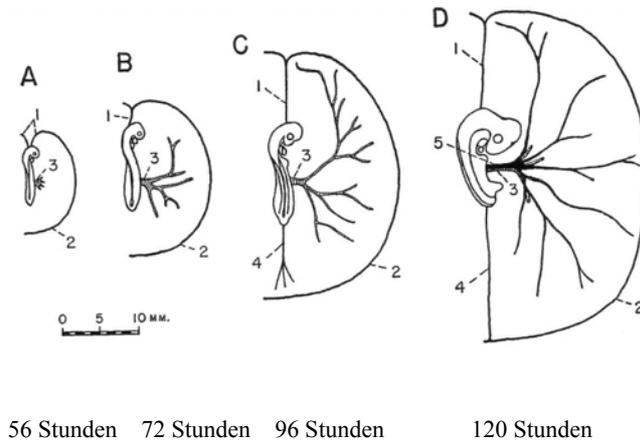


Abb. 7: Die Entwicklung der Hauptblutgefäße des Hühnerembryos zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation (Nachgezeichnet und modifiziert nach Romanoff AL, 1960). A,B,C und D nach 56, 72, 96 und 120 Stunden, alle gleicher Maßstab. 1 = vordere (anteriore) Dottervene, 2 = Sinus terminalis, 3 = Dotterarterie, 4 = hintere (posteriore) Dottervene, 5 = laterale Dottervene



Die Arterien bringen das deoxygenierte Blut in Kontakt mit der CAM, wo der Gasaustausch durch die Eierschale geschieht. Die Vene transportiert das oxygenierte Blut wieder zurück zum Embryo (s. Abb. 8). Diese Gefäße sind äquivalent zu den Nabelgefäßen (Van Golde et al., 1996). Der Embryo erhält seine Nährstoffe aus dem Eidotter über die Dottervene, während das Blut über die Dotterarterie wieder zurück in das Eidotter fließt. Die Entwicklung des Dotterkreislaufes ist in Abb. 7 dargestellt.

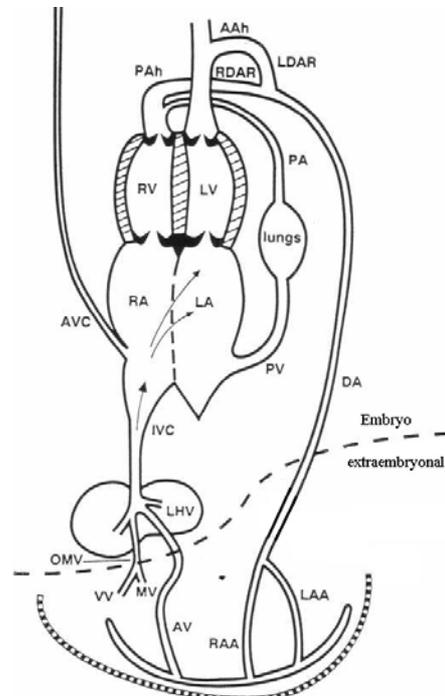
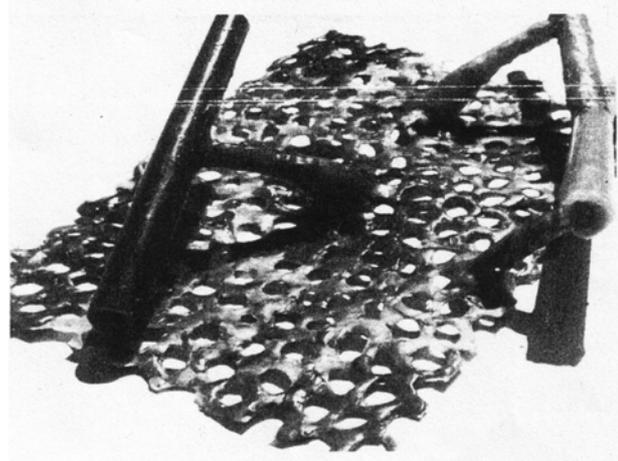


Abb. 8: Schema der Blutzirkulation im Hühnerembryo (nachgezeichnet und modifiziert nach Romanoff AL, 1960; White PT, 1974 und van Golde et al., 1996). Aah: Aortenbogen, AV: Nabelvene, AVC: vordere Hohlvene, DA: dorsale Aorta, IVC: untere Hohlvene, LA und RA: linker und rechter Herzvorhof, LAA und RAA: linke und rechte Nabelarterie, LDAR und RDAR: linker und rechter Ductus arteriosus, LHV: linke Lebervene, LV und RV: linke und rechte Herzkammer, MV: Mesenteriumvene, OMV: Omphalomesenteriale Vene, PA: Lungenarterie, PAh: Lungenbogen, PV: Lungenvene, VV Dottervene

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Nach dem Hervortreten aus der Bauchwand zweigt sich die Nabelarterie in 6 oder 7 Generationen (immer kleiner werdende Arteriolen) auf. Die ersten 5 oder 6 Generationen liegen flach, eng parallel zur CAM Unterfläche und tiefer als die Venen gleicher Ordnung. Dann ändern sie ihre Richtung abrupt und die kleinsten Arteriolen gelangen nahezu vertikal zum Kapillarnetz (Fuchs und Lindenbaum, 1988, s. Abb. 9).

Abb. 9 fotografiertes Wachsmodell der CAM (Fuchs und Lindenbaum, 1988), Ansicht von unten, Der Gefäßbaum in der CAM kann in 2 horizontale Schichten geteilt werden. Die obere äußere Schicht besteht aus einem feinen kapillären Netzwerk, die tiefere enthält die größeren Gefäße bis zur 5. und 6. Ordnung. Dazwischen liegen die prä- und postkapillären Gefäße, welche in schräger oder senkrechter Lage zum oberflächigen kapillären Netzwerk aufsteigen und für die arterielle Versorgung sowie die venöse Drainage desselben verantwortlich sind (Fuchs und Lindenbaum, 1988).



Am Anfang der postkapillären Venolen steht ein schmaler Sinus, der durch Konfluenz der Kapillaren aus dem oberflächigen Netzwerk entsteht. Das kapilläre Netzwerk ist die oberflächennaheste Schicht der extraembryonalen Gefäße und erscheint in die CAM eingebettet, während die tiefer liegenden größeren Gefäße frei beweglich sind (Fuchs und Lindenbaum, 1988; eigene Beobachtung). Die CAM wird von einem dichten Netzwerk von Lymphgefäßen drainiert (Oh et al., 1997).

Zwischen dem CABF (Chorioallantois-Blutfluß) und den Verhältnissen beim Säugerfetus gibt es typische Ähnlichkeiten:

- CABF beträgt über 50 % des Herzauswurfes (Rahn et al., 1985)
- Herzauswurf des Hühnerembryos beträgt 500 ml / kg / min, ein Wert, vergleichbar mit Auswurffractionen von Säugerfeten (Dawes et al., 1954)
- Verteilung des Herzauswurfes als auch der Gasdruck ist vergleichbar mit dem von Schaffeten (Rahn et al., 1985; Olszowka et al., 1988)
- wie die Säugerplazenta ist das extraembryonale Gefäßsystem der CAM nicht innerviert (Kunzi-Rapp et al., 1999).

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Die Architektur der Mikrozirkulation in der CAM ist ähnlich der von reifem Lungengewebe (Fuchs und Lindenbaum, 1988). Obwohl es Unterschiede bei den Dottervenen (White PT, 1974), welche das verdaute Dottermaterial zur Leber transportieren und dem Nabelblut, welches direkt in die linke Lebervene fließt, ohne die Leber zu passieren, gibt, ist die Blutzirkulation im Hühnerembryo vergleichbar mit der des menschlichen Fetus (Van Golde et al., 1996; Lille FR, 1952). Auch bei den Flußgeschwindigkeiten herrschen ähnliche Bedingungen. In Abb. 33, S. 49, ist das Geschwindigkeitsprofil durch eine kleine Venole dargestellt. Die Geschwindigkeit des Blutflusses liegt bei 0,3 – 0,5 mm/s, ein Wert, vergleichbar mit menschlichen Flußgeschwindigkeiten (Venolen, Kapillargebiet). Aus diesem Grund werden auch bezüglich des Zellrollverhalten vergleichbare Verhältnisse im Säugerfetus und Hühnerembryo vermutet.

### 2.4 Bedeutung des CAM-Modells

Für die Wissenschaft hat sich das CAM-Modell bereits für viele Versuche bewährt. So dient es u.a. zur Untersuchung von Ionentransporten (Garrison und Terepka, 1972; Rous und Murphy, 1911; Ausprunk et al., 1974), des Gasaustausches (Metcalfe und Stock, 1993), für Experimente mit Tumortransplantaten (Leighton J, 1967), für auto-, iso-, homo- oder heterogene Transplantationen (Huxley und Murray, 1924; Nicholas und Rudnick, 1933), zur bakteriellen und viralen Kultivierung (Woodruff und Goodpasture, 1931; Zuckerman AJ, 1975) und zur Einschätzung der angiogenetischen Aktivität (Barnhill und Ryan, 1983; Vu et al., 1974).

Aber auch als in vivo Modell zur Bewertung von Angiogenese- und Antiangiogenese-Molekülen (Folkman J, 1984) sowie zur Studie der normalen Angiogenese (Rizzo et al., 1995; Rizzo und DeFouw, 1993) wird es verwendet.

Während der frühen Entwicklung eignet es sich besonders gut zum Studium der Hämodynamik des kardiovaskulären Systems (Nakazawa et al., 1988; Hu und Clark, 1989) und der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (Hu und Clark, 1989), in späteren Stadien ist es ein attraktives Modell zur Untersuchung der Physiologie des Gasaustausches und der Mechanismen, die an der Entstehung von Eingeweidemalformationen beteiligt sind (Tibboel et al., 1979), um nur einige Beispiele zu nennen.

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

### 2.5 Gefäßentwicklung bei Schalen- und schalenloser Kultivierung

Bei der schalenlosen Kultivierung befinden sich die Kapillaren in der Mesodermis der CAM, und nicht in der oberflächlichen Ektoderm, wie es bei CAM's in intakten Eiern der Fall ist, wo sie an der Schalenhaut adhären (Fuchs und Lindenbaum, 1988). Auch befinden sich keine Kapillaren in der Ektoderm einer 18 Tage alten CAM, während in der CAM eines intakten 15 Tage alten Eies die meisten Kapillaren die Ektodermis durchdringen und oberflächlich auf ihr und in Kontakt mit der Schalenhaut liegen (Leighton J, 1967; Ribatti et al., 1999).

Zusätzlich wird das Ektoderm dicker als das einer normalen CAM (Fuchs und Lindenbaum, 1988). Die großen Gefäße liegen tiefer im Mesoderm und sind umhüllt von einer dünnen Schicht Mesenchymzellen aus der Mesodermis und von Epithelzellen aus dem Allantoisendoderm (Fuchs und Lindenbaum, 1988).

Am 14. Tag ist der kapilläre Plexus auf der Oberfläche des Ektoderms lokalisiert, der Schalenhaut anliegend (Ribatti et al., 1999, s. Abb. 10).

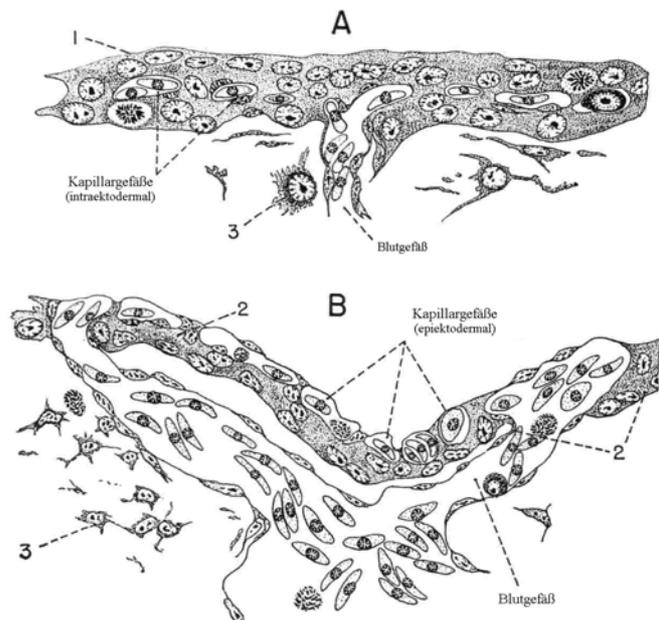


Abb. 10  
Lage der GefäÙe im Ektoderm des Hühnerembryos (normale Kultivierung in der Eischale). Querschnitt durch die oberflächliche Schicht der äußeren Wand der Allantois. Man sieht die 2 verschiedenen Positionen der KapillargefäÙe in Bezug auf das Ektoderm. (Nachgezeichnet und modifiziert nach Romanoff AL, 1960 und Dantschakow W, 1907).  
A: Schnitt von einem 10 - Tage Embryo,  
B: Schnitt von einem 15 - Tage Embryo.  
Beide  $\times 400$ .  
1= Ektoderm (Chorioallantois),  
2= subvaskuläres Ektoderm,  
3= Mesenchym.

### 2.6 Vaskularisation der CAM

#### 2.6.1 Vaskulo- und Angiogenese

Das erste Organsystem, welches sich während der Embryonalentwicklung ausbildet, ist das BlutgefäÙsystem. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da nur so alle sich entwickelnden Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden können

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

(Kalka et al., 2000). Auch dient es zum Abtransport von Stoffwechselendprodukten wie Kohlendioxid sowie zur Verteilung von Botenstoffen, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone, im gesamten Organismus. Bei der Bildung der Blutgefäße werden 2 verschiedene Prozesse unterschieden, die Angiogenese und die Vaskulogenese (Djonov et al., 2000).

Die Vaskulogenese findet als erstes statt. Dabei handelt es sich um eine Neubildung von Gefäßen aus sich in situ differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs, sogenannte Angioblasten, zu Endothelzellen, welche sich dann zu einem Gefäßlabyrinth aneinanderlagern (Kalka et al., 2000). Im Gegensatz dazu kommt es bei der Angiogenese zu einer Ausweitung des Gefäßnetzes durch differenzierte Endothelzellen (Risau W, 1997). Dies kann durch das klassische Aussprossen („sprouting angiogenesis“) von Gefäßen geschehen. In jüngster Zeit wurde noch eine alternative Art der Angiogenese beschrieben, das Einstülpen (Intussusception) von Gefäßen (Non-sprouting angiogenesis, einstülpendes mikrovaskuläres Wachstum - Intussusceptive Microvascular Growth-IMG) (Kalka et al., 2000; Patan et al., 1996; Djonov et al., 2000).

### 2.6.2 Embryonale Vaskulogenese

Die Entwicklung des Gefäßsystems hat ihren Ursprung in der Ausbildung sogenannter Blutinseln, die aus dem splanchnopleuralen Mesoderm des Dottersacks unter dem Einfluß mesoderminduzierender Faktoren der Fibroblasten-Wachstumsfaktor- (FGF-, Fibroblast-Growth-Factor) Familie entstehen (Risau W, 1997).

Beim Aufbau dieser Blutinseln im Dottersack findet sich eine enge räumliche Beziehung zwischen den Elementen des zirkulierenden vaskulären Systems, den hämatopoetischen Zellen und den Zellen, die für die Entwicklung der Gefäße verantwortlich sind, den Endothelzellen (Gilbert SF, 1997).

Während die Zellen im Zentrum der Blutinseln zu hämatopoetischen Stammzellen differenzieren, entstehen aus den peripheren Inselzellen die endothelialen Vorläuferzellen, auch Angioblasten genannt (Kalka et al., 2000). Diese enge räumliche Nachbarschaft sowie die Expression einer Anzahl von Antigenen, wie z.B. den VEGF-Rezeptor KDR/flk-1, den Angiopoietinrezeptor tie-2 und CD 34 weisen auf die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferzelle hin (Choi et al., 1998; Hatzopoulos et al., 1998; Sabin FR, 1920). Durch Wachstum und Fusion der Blutinseln, abhängig vom Sauerstoffgehalt der Gewebe, der Blutflußrichtung, von Scher-

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

kräften sowie von den individuellen Bedürfnissen der unterschiedlichen Organe, wird unter gleichzeitiger Endothelzelldifferenzierung ein vaskulärer Plexus gebildet, der zur Bildung auch größerer Blutgefäße führt. Eine weitere Gefäßreifung erfolgt durch programmierten Zelltod der Endothelzellen (Apoptosis), endotheliale Transdifferenzierung (z.B. die Bildung von Herzklappen), Veränderungen der Gefäßwand sowie Umorganisation der Endothelzellen zu neuen Gefäßen (Kalka et al., 2000).

Die Differenzierung von Angioblasten wird vor allem von Wachstumsfaktoren wie VEGF, dem VEGF-Rezeptor-2 sowie dem bFGF (basic fibroblast growth factor) beeinflusst (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Shalaby et al., 1997).

Es wurde gezeigt, daß die Angiogenese in der CAM in 3 Phasen abläuft: in einer frühen Phase von Tag 5 bis 7 geschieht der Großteil des kapillären Wachstums durch Aussprossen. In einer Zwischenphase von Tag 8 bis 12 gewinnt dann das IMG (s. 2.6.1) die Oberhand und an den Tagen 13 und 14 expandiert die CAM-Struktur nur noch mit geringem Anstieg an Komplexität (Schlatter et al., 1997).

### 2.6.3 Postnatale Vaskulogenese

Lange Zeit war man der Meinung, daß die Vaskulogenese nur während der Embryonalentwicklung stattfindet. Das scheint jedoch nicht so zu sein. Neuere Versuche zeigen, daß endotheliale Vorläuferzellen (EPC) im Knochenmark und im peripheren Blut von Erwachsenen nachgewiesen werden können (Asahara et al., 1997; Lin et al., 2000; Shi et al., 1998). Die Vermehrung und Differenzierung der EPC's wird von vielen Faktoren, wie z.B. VEGF, GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Wachstumsfaktor) und IGF – 1, stimuliert (Takahashi et al., 1999). Diese Vorläuferzellen können dann in ischämische Gebiete wandern und aktiv an der Neubildung von Gefäßen teilnehmen (Asahara et al., 1999).

### 2.6.4 Angiogenese

Die Angiogenese geschieht während der gesamten Lebenszeit des Organismus, z.B. während der Embryogenese, der postnatalen Entwicklung und des Wachstums, der Wundheilung, der Regeneration, bei Entzündungen sowie bei der Krebsentwicklung (Djonov et al., 2000). Dabei kommt es zu einer Gefäßformation aus bereits existierenden Gefäßen, z.B. durch Sprossung. Der Prozeß der Sprossung ist bei

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

vielen physiologischen und pathologischen Betrachtungen bereits untersucht worden und gilt heute als allgemein akzeptiert. Daneben gibt es noch eine weitere, erst seit einigen Jahren beschriebene Art der Angiogenese (Risau W, 1997; u.a.), das Intussusceptive Mikrovaskuläre Wachstum (IMG). Dabei handelt es sich um eine Umformation durch Einstülpung bestehender Kapillaren zu einem kapillären Netzwerk.

Gesteuert wird die Angiogenese u.a. durch die Wachstumsfaktoren transforming growth Factor  $\beta$ , FGFB, TNF $\alpha$  (Yang und Moses, 1990; Olivio et al., 1992). Nach Rizzo und DeFouw, 1993; Dusseau et al., 1986, geschieht die schnellste Phase der embryonalen Angiogenese zwischen dem 10. und 11.Tag.

### 2.6.5 Endothel der CAM

Das Lumen der Gefäße ist ausgekleidet mit Endothelzellen, welche sich während der CAM-Entwicklung und während der Angiogenese mitotisch teilen (Folkman J, 1985). Die durchschnittliche Dicke des Endothels der Arteriolen der 1. und 2. Ordnung reicht von 0,41-0,46  $\mu\text{m}$ , die der Venolen von 0,36-0,46  $\mu\text{m}$  (Rizzo et al., 1995). Diese Werte sind deutlich größer als die von adulten Lungenarteriolen und –venolen (DeFouw DO, 1988). Ähnlich dazu ist die Endotheldicke auch größer als die von adulten Lungen (Rizzo et al., 1995). Die Endotheldicke reduziert sich bis zum Tag 14 (Rizzo und DeFouw, 1993) zur Akkomodation an den steigenden Sauerstoffbedarf des Embryos (Rizzo et al., 1995).

## 2.7 Blutbildung

### a) Allgemeines

Da das Dotter die erste Nahrungsquelle des Embryos ist, werden Blut und Blutgefäße erst im Dottersack gebildet, bevor sie im Embryo entstehen. Die Gefäße enthalten Blutzellen, Blutplasma und absorbiertes Dottermaterial. Das Blut- und Gefäßgewebe differenziert sich gleichzeitig im Dottersack aus dem gleichen Mesodermursprung. Sowohl Blut- als auch Endothelzellen vermehren sich durch Zellteilung. Während der ersten Hälfte der Embryonalentwicklung stammen die meisten Blutzellen aus dem Dottersack, und werden dort bis zum Schlupf weiterhin produziert. Im Embryo ist die Hämatopoese größtenteils auf die Organe beschränkt, welche sich erst in der zweiten Hälfte der Inkubation bilden. Diese Organe übertreffen den Dottersack in der Produktion von Blutzellen allmählich (Romanoff AL, 1960; s. Abb. 11).

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Erythrozyten und Leukozyten sind beide im Vogelblut enthalten. Die Morphologie dieser Zellen zeigt die phylogenetische Verwandtschaft der Vögel zu den Reptilien und zu den Säugern. In Vögeln wie in Reptilien sind die roten Blutkörperchen kernhaltig und haben eine ovale Form. Die Leukozyten im Vogel können wie bei den Säugern in 2 Haupttypen eingeteilt werden, in nichtgranulierte Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) und in granulierte Leukozyten (neutrophile, eosinophile und basophile). Die Lymphozyten sind die überwiegenden weißen Blutzellen, aber ihr Verhältnis zur Gesamtmenge ist sehr variabel (Cullen EK, 1903). Auch kommen spindelförmige Thrombozyten vor, welche bei der Blutgerinnung mitwirken.

### **b) Extraembryonale Blutbildung (im Dottersack)**

Die ursprünglichen intravaskulären Blutzellen werden Megaloblasten genannt (Sugiyama S, 1926) und entwickeln sich nur zu Erythroblasten (Vorstufen der Erythrozyten). Dagegen entwickeln sich die Leukozyten aus extravaskulären Mesenchymzellen (Romanoff AL, 1960).

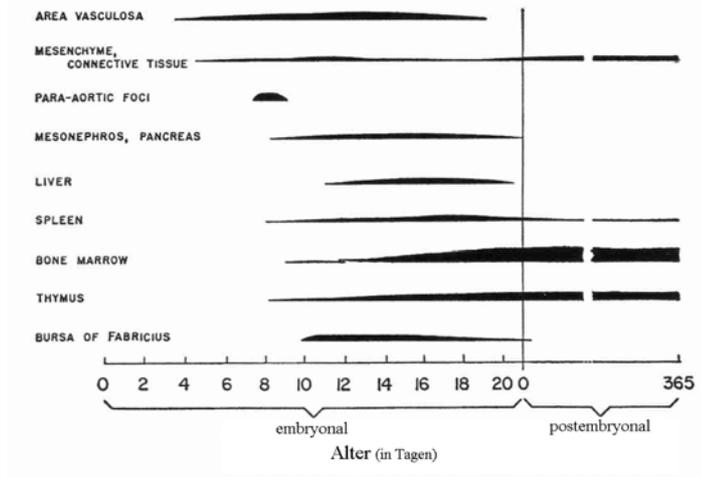
### **c) Intraembryonale Blutbildung**

Dem Abfall der blutbildenden Aktivität im Dottersack am Ende der 2. Inkubationswoche folgt der Beginn der Hämatopoese in den Organen des Embryos. Die unterschiedlichen Blutbildungsaktivitäten in den verschiedenen Organen zeigt Abb. 11. Lange bevor die intensive Blutbildung in den großen blutbildenden Organen (Leber, Milz, Knochenmark) beginnt, werden einige Blutzellen intraembryonal produziert. Dies geschieht wenige Zeit nach Beginn der Produktion im Dottersack. Diese Blutbildungsinseln finden sich bereits ab dem 3. Tag im Endothel der Aorta und anderen Gefäßen sowie im Herz und den Aortenbögen (Dantschakow W, 1909; Jordan HE, 1917). In der Bursa Fabricius beginnen die Erythropoese und die Granulopoese zwischen dem 10. und dem 12. Tag, hören aber in den ersten Tagen nach dem Ausschlüpfen wieder auf (Romanoff AL, 1960). Um den 8. Tag herum treten zusätzliche Foki der Granulozytopoese (manchmal auch der Erythropoese) in verschiedenen Organen des Hühnerembryos auf, z.B. in der Nierenanlage, dem

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Abb. 11

Das Diagramm zeigt die Lokalisation, Intensität (dargestellt durch die Dicke der schwarzen Linien) und die Chronologie der eosinophilen Leukozytopoese im Hühnerembryo vor und nach dem Schlupf. (Gezeichnet und modifiziert nach Terni T, 1924).

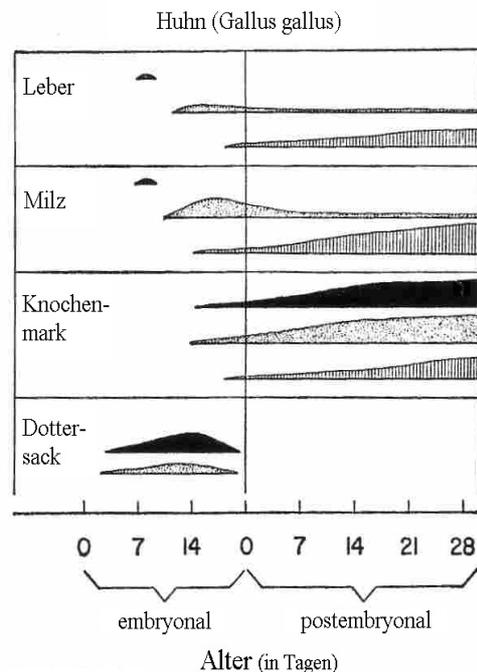


rechten Ovar, der Pankreasanlage und den Gonaden, immer in unmittelbarer Nähe zu den Blutgefäßen (Nonidez JF, 1920).

Wie im Dottersack sind die ersten sich extravaskulär differenzierenden weißen Blutzellen die unreifen eosinophilen Granulozyten. In Abb. 12 sind der Zeitpunkt des Einsetzens und die Intensität der Produktion für die verschiedenen Gewebe dargestellt.

Abb. 12

Schematische Darstellung der Chronologie der Hämatopoese in Leber, Milz, Knochenmark und Dottersack im Huhn während der Embryonal- und frühen Postembryonalzeit. (Nachgezeichnet und modifiziert nach Romanoff AL, 1960). Die Erythropoese wird durch das schwarze Feld dargestellt, die Granulozytopoese durch das gepunktete und die Lymphopoese durch das senkrecht gestrichelte. Die Breite des Feldes gibt die Intensität der Hämatopoese an.



Nach Dantschakow W, 1909, starten zwischen dem 10. und 12. Entwicklungstag die extravaskulären Hämocytoplasten mit der Produktion von „kleinen Lymphozyten“. Diese bringen vermutlich die Makrophagen, Plasmazellen und die Granulozyten

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

hervor. Während der späten Embryonalentwicklung werden basophile und pseudo-eosinophile Leukozyten in der Milz gebildet (Romanoff AL, 1960).

Die ersten entstehenden roten Blutzellen bilden eine primitive Zelllinie, welche degeneriert und durch die definitive Zelllinie ersetzt wird (Engel CS, 1895; Dantschakow W, 1907; Dawson AB, 1936). Die primitiven Zellen dominieren das Blutbild vom 2. bis 4. Tag der Inkubation, beginnen aber ab dem 3. bis 4. Tag abzusterben. Trotz des frühen Beginns des Absterbens können einige Zellen bis zu 2 Wochen nach dem Ausschluß persistieren (Dawson AB, 1936). Gleichzeitig dazu treten zwischen dem 4. und 6. Tag die ersten Zellen der definitiven Zelllinie auf. In beiden Zelllinien werden vergleichbare unreife Zellen ausgebildet, bevor die endgültige Zelle, der Erythrozyt (primitiver oder definitiver), gebildet wird. Schema, Verteilung und Auftreten der verschiedenen Zellen sind in Tabelle 1 und in Abb. 13 dargestellt.

Alter des Hühner- embryos		Prozentsätze der Arten der roten Blutzellen									
		Primitive Linie					Definitive Linie				
		Megaloblasten	Proerythroblasten	Erythroblasten	Proerythrozyten	Erythrozyten	Hämozyto- blasten	Proerythro- blasten	Erythroblasten	Proerythrozyten	Erythrozyten
(Tage)	(Stunden)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	(Prozent)	
2	0	29.6	70.4								
2	16	0.2	4.2	95.4							
3	0	0.2	0.2	14.0	85.4						
3	23			3.0	93.1	0.7	2.0	0.6			
4	16				98.9		0.6	0.4			
4	22				98.8		0.4	0.6			
5	3				9.9	79.5	0.7	2.4	6.9		
5	20					23.9	0.4	0.3	74.9		
6	3					20.3		1.7	36.3	40.6	
7	0					11.7			7.6	80.2	
8	0					10.3			0.2	89.5	
9	0					5.4	0.2		0.9	93.6	
10	0					6.6	0.1		0.4	92.5	
11	0					3.7				96.2	
12	0					3.8	0.6		0.4	95.2	
13	0					4.8			0.5	10.4	
14	0					3.8		0.4	4.2	17.1	
15	0					2.1			0.2	26.9	
16	0					0.5			0.5	6.0	
17	0					0.6				1.9	
18	0					0.2			0.3	0.9	
										84.2	
										74.5	
										70.7	
										92.6	
										97.4	
										98.4	

Tabelle 1

Die Prozentsätze der verschiedenen Arten der roten Blutzellen im Hühnerembryo an den aufeinanderfolgenden Entwicklungstagen. (Gezeichnet und modifiziert nach Dawson AB, 1936 und Romanoff AL, 1960).

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

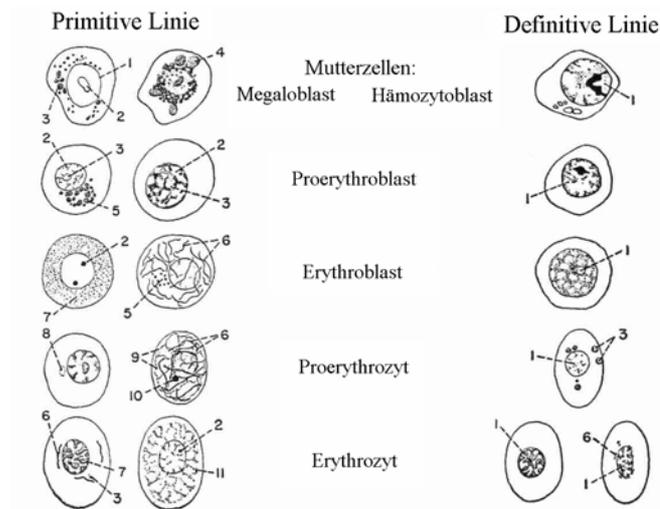


Abb. 13 Die verschiedenen aufeinanderfolgenden Formen in der Differenzierung der primitiven und definitiven roten Blutzellen im Hühnerembryo. (Gezeichnet und modifiziert nach Dantschakow W, 1909; Dawson AB, 1936; Romanoff AL, 1960.)

Die Zellen der primitiven Linie (linke Seite), geordnet nach Ihren sukzessiven Stadien, sind durch verschiedene Methoden zur Darstellung Ihrer Komponenten gefärbt. Die vergleichbaren Formen der definitiven Linie sind auf der rechten Seite gezeigt. Alles x1000.

1 Nukleus, 2 Nukleolus, 3 neutrale rote Granulen, 4 präzipitierte basophile Substanz, 5 Rosette der neutralen roten Granulen, 6 Mitochondrienfilamente, 7 basophile Granulen, 8 „Hof“, 9 zartes Retikulum, 10 Golgi-Apparat, 11 basophiles Retikulum.

### 2.8 Blutzellen

#### a) Morphologie der Erythrozyten und deren Vorläuferzellen

Die roten Blutzellen (primitive und definitive) sind im Embryo größer als im Blutstrom von erwachsenen Hühnern (Romanoff AL, 1960). Die folgende Tabelle 2 gibt die durchschnittliche Größe der roten Blutzellen an.

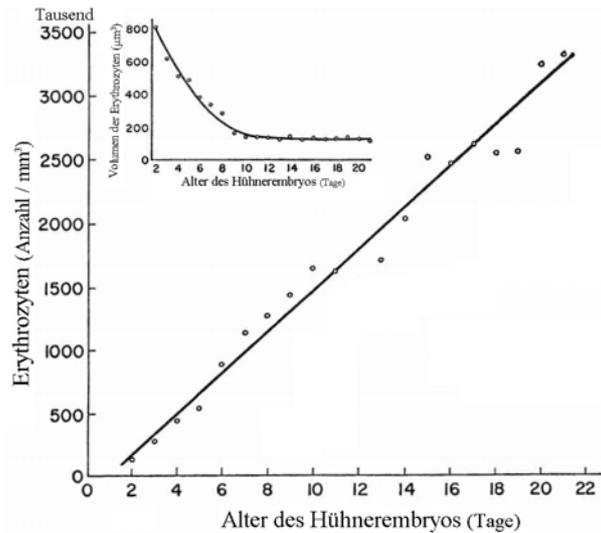
	primitive Proerythro- blasten (rund)	primitive Erythro- blasten (rund)	primitive Erythro- zyten (rund)	definitive Proerythro- blasten (rund)	definitive Erythro- blasten (rund)	definitive Erythro- zyten (rund)	Erythrozyten geschlüpfes Huhn (oval)
Breite	14 µm	13- 8 µm	8,5-12,7 µm	10-12 µm	8-10 µm	7-10,3 µm	5,5-7,5 µm
Länge	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	11-14 µm

Tabelle 2: Durchschnittliche Größe der primitiven und definitiven roten Blutzellen. (Gezeichnet nach Werten von Klieneberger und Carl, 1912; Perri GC, 1948)

Die Anzahl der definitiven Erythrozyten während und nach der Embryonalentwicklung ist in Abb. 14 dargestellt. Am Tag des Schlüpfens sind mit 2,5-3 Mio Zellen über 90% der Erwachsenenanzahl erreicht.

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Abb. 14:  
Anzahl der Erythrozyten im  
Hühnerembryo während der  
Inkubation.  
Insert: Änderung des Volumens  
der Erythrozyten im Blut  
(Gezeichnet und modifiziert  
nach Romanoff AL, 1960.)



Die adulten Erythrozyten sind elliptische Scheiben (Abb. 15), deren Kern in der Mitte liegt und ca.  $5,5 \times 3,5 \mu\text{m}$  mißt. Neben diesen ausgereiften kommen auch Jugendformen, sog. polychromatische Zellen und vereinzelt auch noch Erythro- und Proerythroblasten vor.

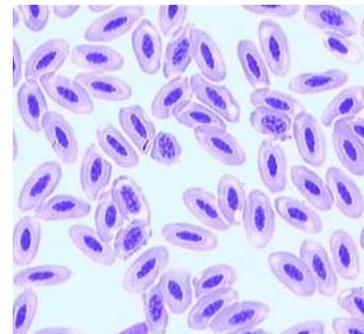


Abb. 15: Gefärbte Erythrozyten aus einem Blutaussstrich vom Papagei. Man sieht vereinzelt die polychromatischen Zellen. Wright's stained. (Phillips KM, 2004)

### b) Leukozyten

Die Pseudoeosinophilen (spezialgranulierte oder heterophile) Leukozyten (Abb. 16a) sind das Analogon der Neutrophilen Granulozyten der Säuger (Barry GH, 1998). Ihr Kern ist meist zweiteilig, wobei die beiden Teile polständig gelagert sind. Sie besitzen eine hohe Phagozytoseaktivität und ein großes Spektrum an antimikrobieller Aktivität (Andreasen et al., 1991; Kogut et al., 1994).

Die eosinophilen Leukozyten (Abb. 16b) besitzen einen ähnlichen Kern, jedoch ist dieser von violetter Farbe und läßt eine deutliche Kernstruktur erkennen. Ein weiterer Unterschied ist, daß nur die eosinophilen Granula eine kräftige Oxidasereaktion geben.

Dagegen besitzen die basophilen Leukozyten (Abb. 16c) einen großen runden Kern, der durch die Granulation oft völlig verdeckt wird. Der Durchmesser aller eben genannten Leukozyten beträgt im Durchschnitt  $10\text{-}12 \mu\text{m}$ .

## 2. Die Chorioallantoismembran (CAM)

Bei den Lymphozyten werden kleine (4-8  $\mu\text{m}$ , im Mittel 7  $\mu\text{m}$ ) und große (12-15  $\mu\text{m}$ ) unterschieden, wobei die kleinen immer in der Mehrzahl sind. Sie stellen meist mehr als die Hälfte aller Blutzellen. Im Aussehen läßt sich kein Unterschied zu den Lymphozyten der Säugetiere erkennen (Abb. 16d). Ihre morphologischen Merkmale gleichen denen der Monozyten (Abb. 16e).

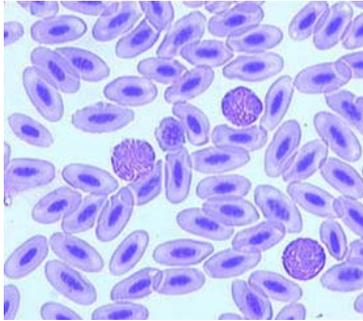


Abb.16a:  
Reife heterophile Leukozyten  
aus dem Blut des Papagei's.  
Wright's stained.  
(Phillips KM, 2004)

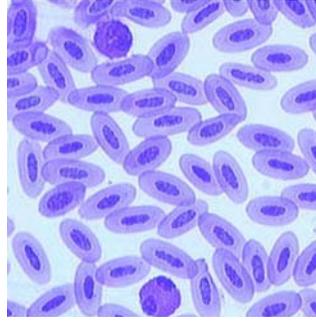


Abb.16b:  
Reife Eosinophile Leuko-  
zyten aus dem Blut der  
Eule. Diff-Quik-Färbung.  
(Phillips KM, 2004)

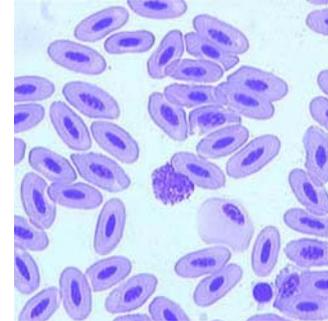


Abb.16c:  
Reife basophile Leukozyten  
aus dem Blut des Papagei's.  
Wright's stained.  
(Phillips KM, 2004)

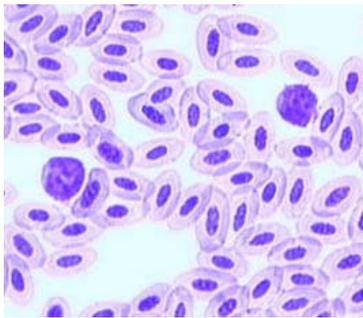


Abb.16d:  
Mittlere bis große Lymphozyten  
aus dem Blut des Kakadus.  
Diff-Quik-Färbung..  
(Phillips KM, 2004)

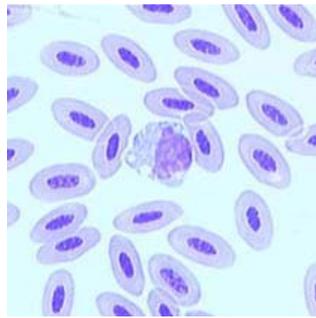


Abb.16e:  
Monozyt aus dem Blut des  
Papagei's. Wright's stained.  
(Phillips KM, 2004)

### c) Sonstige Zellen

Außer den ausgereiften Granulozyten kommen auch vereinzelt große Myelozyten im peripheren Blut vor, wie man sie im Knochenmark findet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Eier und Materialien

- White-Leghorn oder New-Hamshire Eier (von einem benachbarten Biobauer)
- Calcein-AM-Ester™
- CHO-Zellen (chinesische Hamsterovarzellen)
- DNS (Ausgangskonzentration 13,3 µg/µl; mit HEPES-haltigen Puffer (steril) 1:11 verdünnt)
- DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin, 1 mgDOPE/1 ml CHCl<sub>3</sub>)
- EDC (Ethyl-Dimethylaminiopropyl-Carbodiimid)
- FKS (fetales Kälberserum)
- GFP (green fluoreszent protein; grün fluoreszierendes Protein)
- HBS (20 mM HEPES + 150 mM NaCl, pH=7,4)
- Hepes
- Milli-Q (doppelt destilliertes Wasser)
- PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)
- SAINT II Mix
- U937-Zellen (menschliche Myelomzellen)

#### 3.2 Brutschrank

Alle Eier wurden mit einem mit 70% Ethanol durchtränkten Tuch gereinigt, desinfiziert und bei 37,5 °C und 78% rel. Luftfeuchte für 3-4 Tage im Brutschrank inkubiert (Abb. 17). Es wurden zwei Arten von Brutschränken verwendet. Im ersten mußte die Luftfeuchtigkeit manuell geregelt werden. 2 Wannen innerhalb des Brutschrankes wurden mit

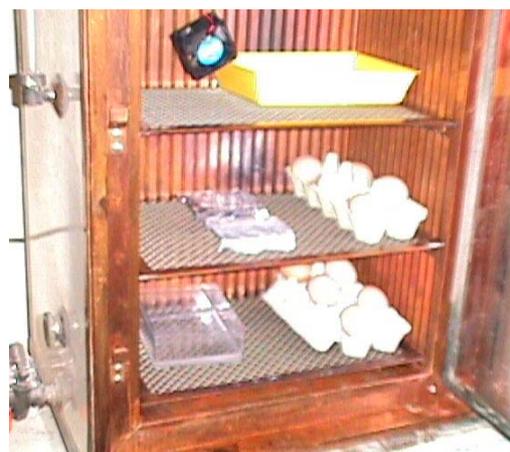


Abb. 17  
Brutschrank 1 zur Inkubation der Hühnerembryos (ohne CO<sub>2</sub>). Für eine konstante und gleichmäßige Verteilung der Luftfeuchtigkeit sorgten 2 mit Wasser gefüllte Wannen sowie ein kleiner Ventilator.

destilliertem Wasser gefüllt, welches täglich gewechselt wurde. Für die gleichmäßige Verteilung der Luftfeuchtigkeit sorgte ein kleiner Ventilator. Alternativ dazu wurde ein Brutschrank des Types WTC Binder benutzt. Dieser erlaubte ein exaktes Einstellen der Luftfeuchte sowie der vorhandenen CO<sub>2</sub> – Konzentration.

### 3.3 Kultivierungsmethoden

#### 3.3.1 In ovo Kultur, einfach gefenstert

Bei der in ovo Methode wurden am 4. Tag 5 ml Eiweiß am stumpfen Pol des Eies entnommen. Dies geschah, indem mit einer 0,80 mm dicken Stahlkanüle die Schale durchstoßen und mit einer Spritze die gewünschte Menge an Eiweiß entnommen wurde. Danach wurde auf der Oberseite der Schale ein ca. 2 × 1,5 cm großes ovales Fenster geschnitten, welches mit Tesafilm überklebt wurde.

Bei der Betrachtung unterm Stereomikroskop wurde die Folie entfernt. Daraufhin konnte der Embryo sowie die sich entwickelnde CAM gut betrachtet werden. Anschließend wurde das Fenster wieder verklebt. Das Ei konnte wieder in den Brutschrank eingelegt und bei Bedarf erneut betrachtet werden.

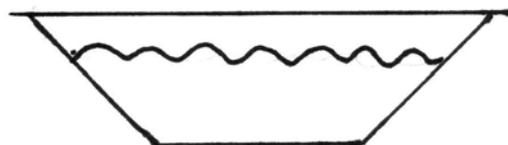
#### 3.3.2 In ovo Kultur, doppelt gefenstert

Bei dieser Methode wurde wie oben beschrieben (3.3.1) 5 ml Eiweiß entnommen und ein ovales Fenster in die Eischale geschnitten. Zusätzlich dazu wurde das Fenster mit doppelseitigem Klebeband umrundet und mit dehnbare Folie dicht verschlossen. Das war notwendig, da nun die Eier gedreht werden mußten und das Fenster unten zu liegen kam. Daraufhin wurde oben ein zweites ovales Fenster eingeschnitten und mit Tesafilm überklebt. Die Betrachtung unterm Stereomikroskop erfolgte wie bei der einfach gefensterten Methode.

#### 3.3.3 „Spiegeleikultur“

Die Eier wurden am Tag 3,5 ähnlich wie Spiegeleier aufgeschlagen und in verschiedenen Behältern kultiviert. Diese wurden mit desinfizierter Alufolie bedeckt und weiter inkubiert (Abb. 18).

Abb.18  
Waageschale für die „Spiegeleikultur“  
Maße: Grundfläche 6 cm<sup>2</sup>,  
obere Fläche 7 cm × 7 cm, h = 2 cm



Desweiteren wurden folgende Experimente durchgeführt:

- Inkubation mit/ ohne CO<sub>2</sub> (1,5 %):  
Durch Benutzung des Brutschrankes WTC Binder, Typ 3621006000330, wurde der Einfluß von 1,5 % CO<sub>2</sub> auf die Überlebensrate der Embryos ermittelt.
- Zufuhr von Kalzium durch Zugabe von Kalziumcarbonat am 9. Tag (Rizzo und Defouw, 1993) respektive 5 mg Eierschalengranulat; dieses wurde vor dem Aufschlagen der Eier in die Gefäße eingebracht.
- Zugabe von 5 ml antibiotikahaltiger Ringerlaktatlösung nach Aufschlagen der Eier

#### 3.4 Injektion

##### 3.4.1 Injektionssubstanzen

- FITC-Partikel (Fluoresbrite Carboxy Microspheres, 2,2 µm, 2,5 % solides Latex)
- CHO/CHOE-Zellen (beladen mit Calcein-am-Ester™)
- t-CHO/t-CHOE-Zellen (mit GFP bzw. GFP und E-Selektin transfektierte CHO-Zellen)
- U937-Zellen
- beschichtete Partikel
- Leukozyten (Huhn)

##### 3.4.2 Herstellung der Injektionssubstanzen

###### a) Transfektion von CHO-Zellen mit GFP/E + GFP

Für die Transfektion wurde die SAINT-Methode (V.Oberle), eine Art der Lipofektion, in leicht modifizierter Form benutzt. Dabei wurden die Zellen, wie folgt beschrieben, entweder nur mit GFP transfiziert oder mit EGFP (E-Selektin + GFP) kotransfiziert.

Zellansatz:

Die Zellkonzentration für den Reaktionsansatz liegt bei  $1,5-2,0 \times 10^5$  Zellen/ml für eine Fläche von 1,77 cm<sup>2</sup>. Dieser Ansatz wurde 1 Tag vor dem Transfektionsansatz hergestellt. Am Tag der Transfektion wurde 3 h vor Ansatz der Transfektion pro Well (Vertiefung) 1 ml serumfreies Medium auf die Zellen aufgetragen.

Temperatur: 37 °C, CO<sub>2</sub> – Konzentration: 5 %

### 3. Material und Methoden

Herstellung des SAINT-Mixes:

2 mg Saint II + 2 mg DOPE mischen, unter Stickstoff das organische Lösungsmittel abziehen und anschließend im Vakuum trocknen. Es wurde mit 4 ml Milli-Q aufgefüllt, gevortext und 5 min im Ultraschallbad inkubiert, bis eine opaleszente Lösung entstand. Diese Suspension war ca. 1 mMolar in Bezug auf die Gesamtlipidmenge.

Zusammensetzung des Transfektionsansatzes:

Mischung a) 200  $\mu$ l HBS +  
100  $\mu$ l SAINT-Mix

Mischung b) 100  $\mu$ l HBS + 10  $\mu$ g DNS (GFP-spezifisch)

Unmittelbar vor der Transfektion wurden beide Mischungen (a und b) hergestellt, dann zusammengegeben und 5 Minuten gemischt.

Transfektion:

- Zugabe des Transfektionsansatzes auf den Reaktionsansatz (Zellansatz).
- Zeiteinwirkung: 90-120 min
- Nach abgeschlossener Reaktionszeit kurz mit HBS spülen und mit FKS-haltigen Medium auffüllen.

Am nächsten Tag wurden die Zellen unter Zugabe von G418 umgesetzt. Nach einwöchiger Kultivierung wurden die am stärksten fluoreszierenden Zellen am FACS aussortiert und entweder weiterkultiviert, eingefroren oder für die Experimente direkt verwendet. Die eingefrorenen Zellen konnten zu beliebigen Zeitpunkten aufgetaut und ebenfalls für die Experimente verwendet werden.

#### **b) Beschichtung der Partikel mit BSA/P-Selektin**

Die FITC-Partikel (s. 3.4.1) wurden, wie folgt beschrieben, jeweils entweder mit P-Selektin oder mit Bovinen Serumalbumin (BSA) beschichtet.

Als Ausgangssubstanz dienten 50  $\mu$ l carboxylierte FITC-Partikel:

- ➔ + 1ml PBS
- ➔ + 5 mg (5 mg/ml) EDC → 6 h stehen lassen, langsam schütteln
- ➔ zentrifugieren (3000 U/min, t= 5 min, Überstand abgießen)

### 3. Material und Methoden

P-Selektin-Beschichtung: + 0,5 mg P-Selektin (0,5 mg/ml), mit PBS-Puffer auf 1 ml auffüllen

BSA-Beschichtung: + BSA-Lösung (im Verhältnis 1:1 dazugeben)  
- anschließend mit PBS-Puffer auf 1 ml auffüllen

Beide Lösungen 12 h schütteln, danach abzentrifugieren und 1 ml PBS dazugeben. Die hergestellten Stammlösungen wurden bei +5 °C gelagert und dienten als Ausgangssubstanz für die Versuche mit den beschichteten Partikeln.

Herstellung der Injektionslösung:

Von der Stammlösung wurden 20 µl mit PBS-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Diese Injektionslösung wurde 15 min vor Injektionsbeginn auf 38 °C erwärmt.

#### c) Leukozyten (Huhn)

Leukozyten von erwachsenen Hühnern wurden entnommen und mit PBS-Puffer verdünnt, bis eine Konzentration von 1 Mio Zellen/ml erreicht wurde. Von dieser Lösung wurden 5 ml mit 2,5 µg Calcein-AM-Ester™ vermischt und eine halbe Stunde vorsichtig in der Hand geschüttelt. Nach Abzentrifugation bei 1300 U/min (3') wurde der Überstand abgeschüttet und mit PBS-Puffer aufgefüllt, bis die Konzentration von 1 Mio Zellen/ml wieder erreicht war. Die CHO/CHOE-Zellen wurden wie die Hühnerleukozyten mit Calcein-AM-Ester™ beladen. Die Ausgangskonzentration konnte bis max. 5 Mio Zellen/ml gewählt werden.

#### 3.4.3 Kanülenherstellung

Für die Technik der Mikroinjektion wurden Glaskanülen mit einem Außendurchmesser von 40-100 µm und einem Innendurchmesser von 20-80 µm, je nach Verwendungszweck, benötigt. Die Kanülen wurden eigens für diesen Zweck hergestellt. Ausgangsmaterial waren Hohlzylinderrohlinge aus Glas mit 10 cm Länge und einem Außendurchmesser von 1 mm (Innendurchmesser 0,8 mm).

Zum Ausziehen der Kanülen wurde der „P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller“ benutzt. Es resultierte eine Glaskanüle mit einer sehr feinen Spitze (Ø 500 nm),

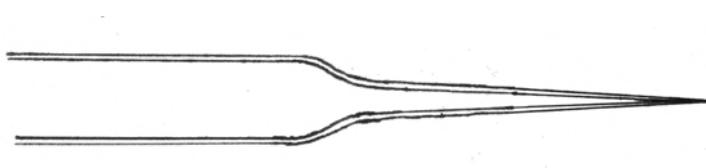


Abb. 19a  
Glaskanülenspitze (Öffnung verschlossen) nach eigener Herstellung im „Micropipette Puller“.

### 3. Material und Methoden

welche jedoch vorne noch verschmolzen war (Abb. 19a). Durch das manuelle Kürzen mit einer kleinen Schere wurde die Kanüle geöffnet. Dabei konnte der Durchmesser der Öffnung je nach Schnittlage variiert werden. Um exakte Maße zu erhalten und die Kanülen einheitlich zu gestalten, wurde der Schnitt unterm Mikroskop durchgeführt und die entstandene Kanülenöffnung mittels einer Mikroskopskala auf ihre Größe hin überprüft. Nach dem Kürzen der Kanülen war eine unregelmäßig geformte, stumpfe Öffnung entstanden (Abb. 19b), mit der ein problemloses Durchstechen der CAM sowie der Gefäßwände, vor allem atraumatisch, nicht möglich war.



Abb. 19b  
Stumpfe Kanülenspitze nach Öffnung der Kanüle mit der Schere.

Um eine glatte und angeschrägte Oberfläche zu erhalten, wurden die Kanülen mit einem Kanülenschleifgerät, Typ TMB 100, angeschliffen. Der Anstellwinkel der Kanüle, und somit der daraus folgende Öffnungswinkel, konnte ebenfalls von  $5^\circ$  -  $90^\circ$  eingestellt werden. Wichtig war, während des gesamten Schleifvorganges auf eine ausreichende Wasserspülung zu achten, um die entstandenen Splitterpartikel zu entfernen. Nur so konnte eine saubere Schlieffläche erreicht werden (s. Abb. 19c).



Abb. 19c  
Geschliffene Kanülenspitze, zur Mikroinjektion geeignet.

Die so entstandenen Kanülen mußten gleich nach dem Beschleifen gereinigt werden. In der feinen Öffnung befand sich aufgrund des kapillären Sogs noch Wasser, vermischt mit feinsten, abgeschliffenen Glaspartikeln. Das Eintrocknen dieses Gemisches führte zur Verstopfung der Kanülenspitze. Zur Reinigung wurde die Kanülenspitze in ein Bad mit destilliertem Wasser getaucht. Gleichzeitig wurde mittels Mikroinjektor (s. 3.5 Injektionstechnik) Luft durch die Kanüle geblasen. Nach einer Zeit von 10s war die Kanüle frei von Fremdstoffen, wurde getrocknet und konnte bis zur Verwendung gelagert werden.

Die Maße der Kanülenspitzen variierten je nach Herstellung und betrug 20 - 80  $\mu\text{m}$  (Innendurchmesser). Der Kanülenkörper hatte immer die gleichen Maße, einen

Innendurchmesser von 0,8 mm bei einer Länge von 70 mm. Das Volumen für eine Füllung war max. 35  $\mu$ l. Der Anschliffwinkel betrug 30 °.

#### 3.5 Injektionstechnik

##### a) Der Mikromanipulator und Mikroinjektor

Als Kanülenhalter und Steuergerät wurde der Eppendorf Mikromanipulator 5170 (s. Abb. 20) verwendet. An diesem waren 2 Stufen, schnell und langsam, einstellbar.

Im schnellen Arbeitsgang konnte die Kanüle grob platziert werden, wogegen der langsame Modus ein exaktes Einstechen erlaubte. Das Laden der Kanülen mit der zu injizierenden Substanz erfolgte mittels Eppendorf Mikrolader (Nr. 5242956.003). Dadurch wurde gewährleistet, daß das Injektionsgut ohne Verunreinigungen und Luftbläschen bis in die Spitze der Kapillare eingeführt werden konnte. Die Injektion selbst erfolgte mittels des Eppendorf Mikroinjectors 5242 (s. Abb. 21). Die Injektionszeit war in Schritten von 0,1 s zwischen 0,1 s und 9,9 s einstellbar, konnte jedoch auch manuell erfolgen. Der Injektions-



Abb. 20 Der Mikromanipulator  
2 Arbeitseinstellungen ermöglichen ein übersichtliches und präzises Platzieren der Injektionskanülen.



Abb. 21 Der Mikroinjektor  
Mit den Einstellschrauben P1-P3 können Eingangs-, Injektions- und Haltedruck gesteuert werden.

druck (P2) war zwischen 0 und 1500 hPa frei einstellbar. Um den auftretenden Kapillarsog zu kompensieren war ein Haltedruck (P3) zwischen 0 und 500 hPa einstellbar (s. Abb. 21). Dieser lag ständig an der Kapillare an.

##### b) Injektionsort

Die Injektion erfolgte in eine Vene 2. oder 3. Ordnung (Abb. 22). Venen 1. Ordnung waren zu klein, um angestochen zu werden. Größere Venen hatten ab dem 7. Tag eine zu starke Gefäßwand, welche sich nicht ohne größeren Blutverlust anstechen

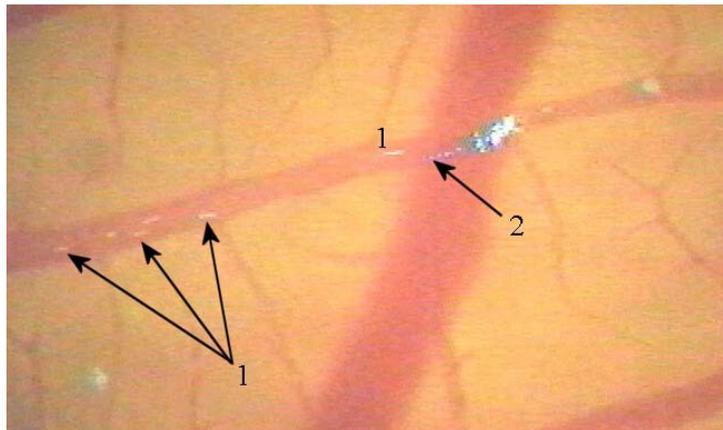
ließ. Sämtliche Arterien waren für die Injektion ungeeignet, da der hohe arterielle Druck sofort zu starken Blutungen führte.

#### c) **Injektionskonstanten:**

Die Objekte wurden mit folgenden Konzentrationen und Parametern injiziert:

- FITC-Partikel (be- und unbeschichtet):  $c = 1 \mu\text{l/ml}$ ,  $p = 500 \text{ hPa}$ ,  $t = 0,4 \text{ s}$
- CHO(E)- ; t-CHO(E)- Zellen:  $c = 1 \times 10^6 \text{ Zellen} / 100 \mu\text{l}$ ,  $p = 700 \text{ hPa}$ ,  $t = 0,4 \text{ s}$
- U937 Zellen; Leukozyten (Huhn): wie CHO-Zellen

Durch mehrmaliges Auslösen der Injektion konnte die Injektionsmenge gesteuert werden. Dabei durfte die Obergrenze ( $100 \mu\text{g/g}$  Embryogewicht; Gawlowski et al., 1982) nicht überschritten werden, um die embryonale Hämodynamik nicht wesentlich zu verändern (Wagman et al., 1990).



### 3.6 Makroinjektion

#### a) **Material**

Einmal-Insulinspritzen (Micro-fine, U - 40 Insulin)

Injektionssubstanzen:

- beschichtete Partikel (Stammlösung [s. 3.4.2 / b] 1:30 mit PBS-Puffer verdünnt)
- CHO/CHOE-Zellen ( $c = 3 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ )
- t-CHO/t-CHOE-Zellen (Konzentration wie CHO-Zellen)
- U937-Zellen (Konzentration wie CHO-Zellen)

#### **b) Injektionstechnik**

Die Insulinspritze wurde mit 0,25 ml Injektionssubstanz aufgezogen. Der Einstich erfolgte senkrecht zur Vene, welche komplett durchstoßen wurde. Der Kanülenschliff zeigte nach proximal. Danach wird die Kanüle so weit zurückgezogen, bis sich die Kanülenöffnung auf gleicher Höhe mit der durchstoßenen Vene befand. Dann konnten max. 0,1 ml injiziert werden. Am besten eigneten sich die Venen der 4. -5. Ordnung. Bei wiederholten Fehlschlägen der Injektion konnte auch eine Vene höherer Ordnung angestochen werden.

#### **3.7 Fotos**

Von einigen Embryos wurden Fotoserien (s. Fotoatlas) bzw. einzelne Bilder hergestellt. Für alle Fotografien wurde (wenn nicht anders beschrieben) eine digitale Kamera (Mavica) benutzt. Die nach der „Spiegeleimethode“ aufgeschlagenen Embryos sowie deren CAM wurden täglich fotografiert. Gestorbene Hühnerembryos wurden präpariert, mit Ethanol (70 %) gesäubert, desinfiziert und ebenfalls fotografiert, anschließend erneut in Ethanol (70 %) eingelegt und zu Demonstrationszwecken aufbewahrt. Zur Darstellung der einzelnen Entwicklungsabschnitte der Embryos wurde jedem Entwicklungstag das dazugehörige Stadium nach Hamburger-Hamilton (Hamburger und Hamilton, 1951) sowie die Entwicklung der CAM zugeordnet (s. Abb. 41-61, Seiten 69-78).

Die restlichen Bilder entstanden per Videomikroskopie (s. u.) durch Herauslösen von Einzelbildern.

#### **3.8 Videomikroskopie**

Die Embryos und die extraembryonalen Blutgefäße wurden durch ein Stereomikroskop (Leica, MZFLIII) betrachtet. Auf eine Temperatur kontrollierende Einrichtung, wie von vielen Autoren (Rizzo et al., 1995, u.a.) verwendet, wurde aus Kostengründen verzichtet. Unter UV-Licht konnten mit dem verwendeten GFP1-Filter grün fluoreszierende Substanzen beobachtet werden. Durch Umschalten wurde das Bild zu einer digitalen Videokamera (Panasonic, Typ GP-KR222) geleitet und mittels eines Videorekorders (Mitsubishi HS-5168) aufgenommen.

Die Auswertung der aufgezeichneten Sequenzen erfolgte auf verschiedene Arten. Kürzere Sequenzen (bis 2 min) wurden mittels Software (Vidcap) als avi-Datei

(digitale Videodatei) auf die Festplatte des Computers gespeichert. Durch Abspielen mit verschiedenen Geschwindigkeiten konnten die Sequenzen genau betrachtet und ausgewertet werden. Die andere Möglichkeit bestand darin, einen Videorekorder mit schrittweiser manueller Wiedergabe (Panasonic NV-HD660) zu benutzen. Durch manuelles Weiterschalten konnte die aufgenommene Sequenz Bild für Bild (im Abstand von 40 ms) betrachtet werden.

#### **3.9 Auswertung Injektion**

Die Auswertung der Injektion der beschichteten Partikel erfolgte meist nach der Methode der Videoauswertung (schrittweise manuelle Wiedergabe). Durch eine Meßaufnahme mit unterschiedlicher Vergrößerung einer geeichten 100 µm-Skala wurde für jede Vergrößerung der genaue Umrechnungsfaktor bestimmt, um aus der Entfernung zweier Punkte auf dem Monitor die wirkliche Strecke berechnen zu können. Die entsprechende Zeit zwischen 2 Bildern ergibt sich aus der Anzahl der manuell weitergedrehten Bilder (40 ms/Bild). Von den intravasal detektierten Partikeln wurden folgende Größen gemessen bzw. berechnet:

- Geschwindigkeit (in den Kapillargefäßen und Venolen der 1. bis 4. Ordnung)
- Anzahl der beobachteten Partikel

Anschließend wurden die Geschwindigkeitswerte der mit Selektin beschichteten Partikel mit den BSA-Kontrollpartikeln verglichen.

Für die Darstellung des Zellrollens wurde zusätzlich zu der einfachen Videoauswertung noch eine andere Methode verwendet. Einzelne Bilder des Filmes wurden so überlagert, daß nur die ganz hellen Farben, welche den fluoreszierenden Partikeln entsprechen, auf das neu entstehende Gesamtbild übernommen wurden. Das entstandene Bild wurde verwendet, um Weg, Zeit und Geschwindigkeit der jeweils fluoreszierenden Objekte zu ermitteln und auf einem Bild zu protokollieren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kultivierung

Mit der „Spiegeleimethode“ konnten die Hühnerembryos bis zum Tage des Schlupfes am Leben erhalten werden. Es zeigte sich aber, daß durch Verwendung von 1,5% CO<sub>2</sub> die Überlebensquote (entspricht kleinerer Absterbrate) deutlich erhöht werden konnte (Abb. 23).

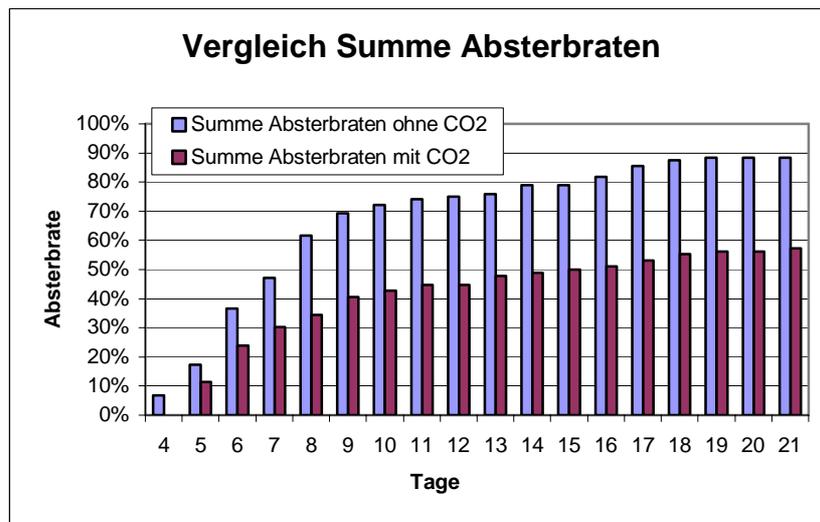


Abb.23: Vergleich der Summe der Absterbraten (bis zum jeweiligen Tag) der Embryos in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration. Alle durch Experimente gestorbenen Embryos sind herausgerechnet.

### 4.2 Injektion von CHO-, CHOE- und U937-Zellen

Die injizierten CHO/CHOE-Zellen sowie die U937-Zellen adhärten bereits nach einigen Sekunden post injektionem im gesamten Blutkreislaufsystem und standen somit zur Geschwindigkeitsbestimmung und differenzierten Auswertung nicht zur Verfügung (Abb. 24).

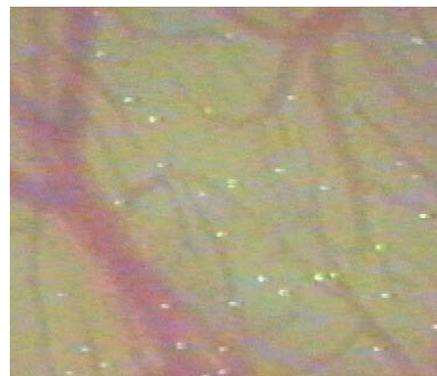


Abb. 24:  
Adhärierende U 937-Zellen.  
Zustand 20 s nach Makroinjektion der U 937-Zellen in einen 17 d Embryo. Fast sämtliche Zellen sind am Gefäßendothel adhärirt.  
(Eigene Aufnahme, Vergr. × 24)

### 4.3 Injektion und Vergleich der beschichteten Partikel

Bei der Betrachtung der beschichteten Partikel zeigte sich erwartungsgemäß meist eine Geschwindigkeitszunahme abhängig vom Grad der Gefäßordnung und vom Entwicklungstag

(Abb. 26a-c). Bis auf die nachfolgend aufgeführten Abweichungen nahm die Geschwindigkeit in allen Gefäßordnungen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), beim Vergleich der Entwicklungstage vom

7. bis 10. Tag signi-

fikant ( $p < 0,05$ ) und vom 10. bis 17. Tag nicht signifikant zu (s. Abb. 27a-e; Tabelle 4, S. 64). Ausnahmen traten am 10. und 17. Tag beim Vergleich der 3. mit der 4. Gefäßordnung sowie beim Vergleich aller Gefäßordnungen zwischen dem 10. und 17. Entwicklungstag auf (Geschwindigkeitszunahme nicht signifikant,  $p > 0,05$ ). In diesem Fall verringerten sich die Geschwindigkeiten der mit P-Selektin beschichteten Partikel am 17. Tag sogar gegenüber denen am 10. Tag. Beim direkten Vergleich der mit P-Selektin und der mit BSA beschichteten Partikel zeigte sich eine signifikant verringerte Geschwindigkeit in den Gefäßen der 0. Ordnung am 7. Tag ( $p = 0,031$ ) und denen der 2. Ordnung am 10. Tag ( $p = 0,027$ ). Bei den 17 Tage alten Embryos war die Geschwindigkeit der selektinbeschichteten Partikel in allen Ordnungen signifikant, in der 2. Ordnung hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) erniedrigt. Alle Werte sind in den Abbildungen 28a-c (S. 39-40) und 34-36 (S. 51-53) dargestellt.

Der Anteil der Partikel, die sich mit entsprechender Geschwindigkeit bewegten, ist in den Abb. 37-40 (S. 65-68) dargestellt. Je höher der Peak, um so mehr Partikel bewegen sich mit der jeweiligen Geschwindigkeit. Je weiter rechts der Peak ist, um so größer war die Geschwindigkeit der Mehrzahl der Partikel.

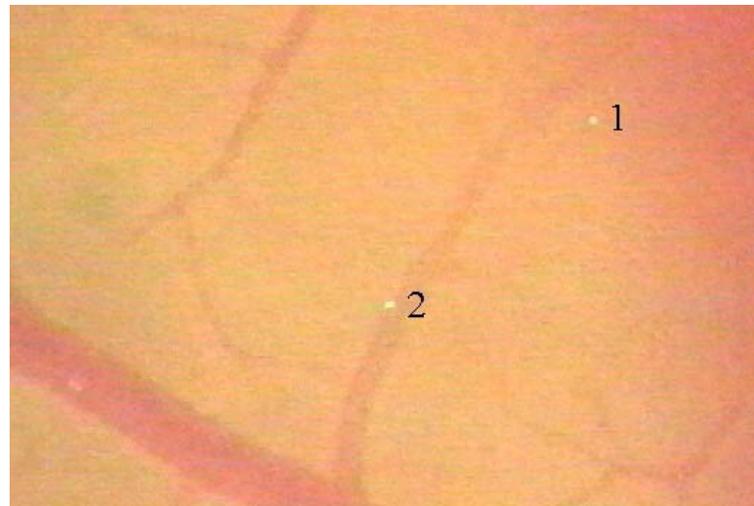
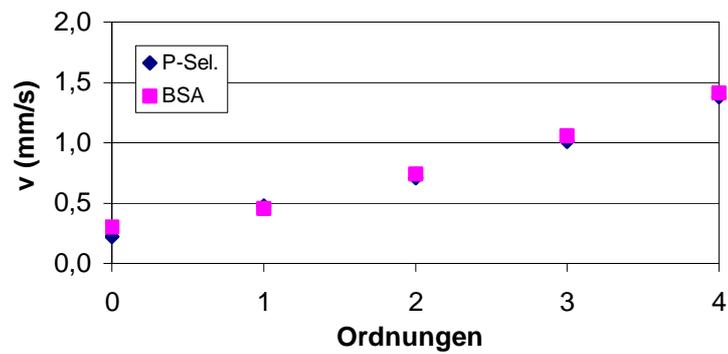


Abb. 25: Die mit BSA beschichteten Partikel bewegen sich intravasal im 7d Embryo. Eigene Aufnahme, Vergr.  $\times 40$   
1 = Partikel im Kapillargefäß 2 = Partikel in Vene 2. Ordnung

## 4. Ergebnisse

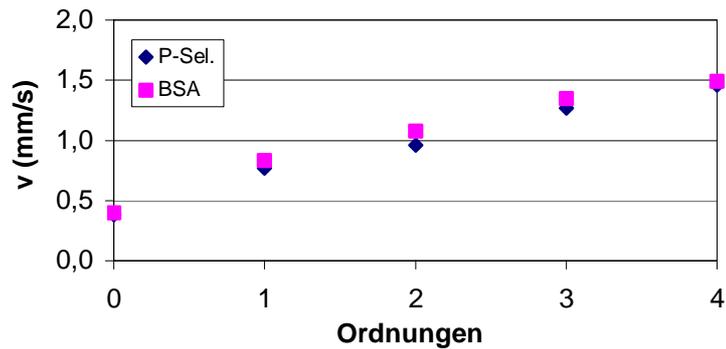
### Geschwindigkeiten (Mittelwerte) im 7d, 10d und 17d Embryo

**Geschwindigkeit (Mittelwerte)  
im 7d Embryo**



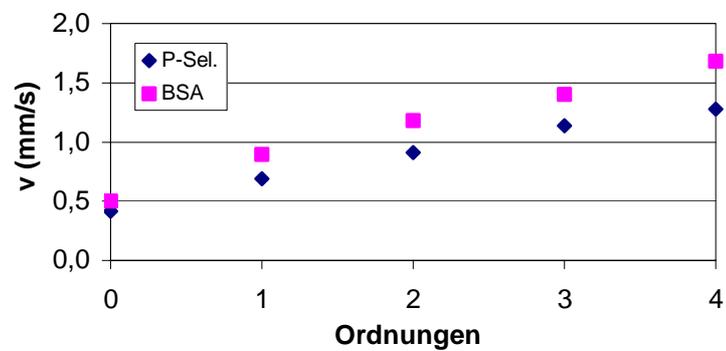
26a

**Geschwindigkeit (Mittelwerte)  
im 10d Embryo**



26b

**Geschwindigkeit (Mittelwerte)  
im 17d Embryo**



26c

Abb. 26a-c:  
Vergleich der Mittelwertgeschwindigkeiten im 7, 10 und 17 Tage alten Hühnerembryo in Abhängigkeit von den Gefäßordnungen. Partikel mit P-Selektin bzw. mit BSA beschichtet.

## 4. Ergebnisse

### Geschwindigkeiten (Mittelwerte) in jeder Ordnung am 7., 10. und 17. Entwicklungstag

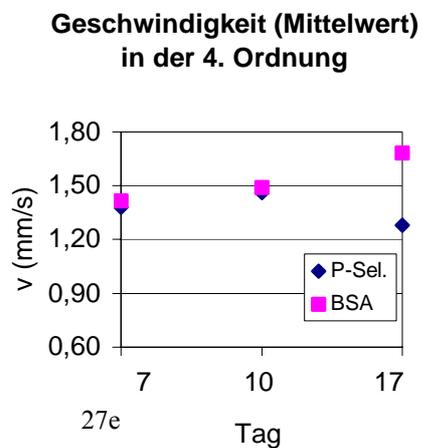
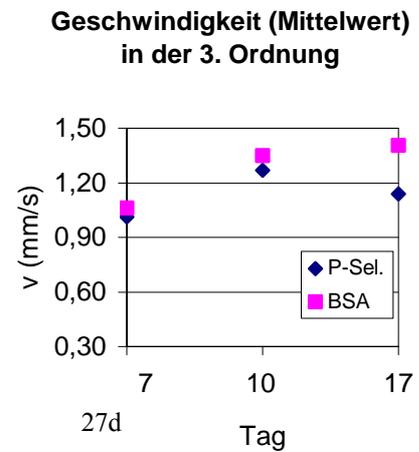
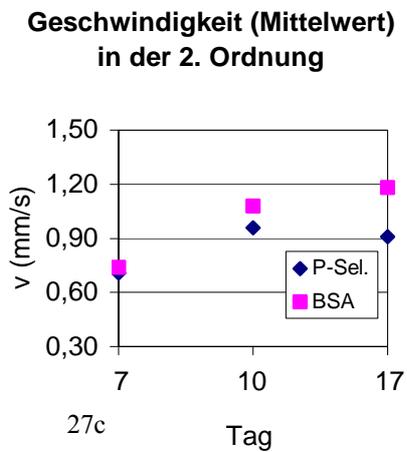
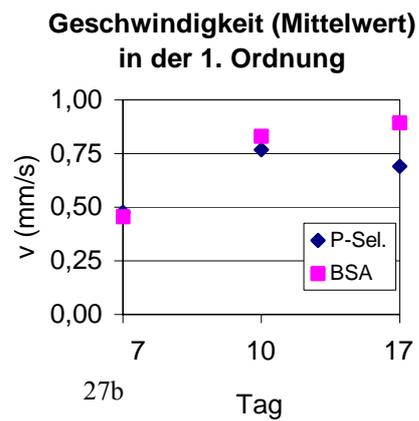
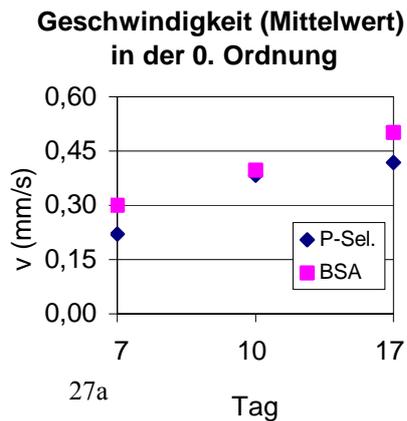


Abb. 27a-e:  
Vergleich der Mittelwertgeschwindigkeiten im 7, 10 und 17 Tage alten Hühnerembryo in allen Gefäßordnungen. Partikel mit P-Selektin (blau) bzw. mit BSA (lila) beschichtet.

## 4. Ergebnisse

### Vergleich aller Ordnungen im gleichaltrigen Embryo

#### P-Selektin im 7d Embryo

Ordnung	MW	Stab	p-Wert im Vergleich zu Ordnung			
			1	2	3	4
0	0,22	0,11	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1	0,48	0,21	X	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	0,71	0,32	X	X	<0,0001	<0,0001
3	1,01	0,40	X	X	X	<0,0001
4	1,38	0,51	X	X	X	X

#### P-Selektin im 10d Embryo

Ordnung	MW	Stab	p-Wert im Vergleich zu Ordnung			
			1	2	3	4
0	0,38	0,46	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1	0,77	0,29	X	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	0,96	0,31	X	X	0,001	<0,0001
3	1,27	0,59	X	X	X	0,152
4	1,46	0,44	X	X	X	X

#### P-Selektin im 17d Embryo

Ordnung	MW	Stab	p-Wert im Vergleich zu Ordnung			
			1	2	3	4
0	0,42	0,19	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1	0,69	0,51	X	0,002	<0,0001	<0,0001
2	0,91	0,38	X	X	0,01	<0,0001
3	1,14	0,52	X	X	X	0,24
4	1,28	0,49	X	X	X	X

#### BSA im 7d Embryo

Ordnung	MW	Stab	p-Wert im Vergleich zu Ordnung			
			1	2	3	4
0	0,30	0,15	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1	0,49	0,22	X	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	0,74	0,37	X	X	<0,0001	<0,0001
3	1,06	0,40	X	X	X	<0,0001
4	1,41	0,51	X	X	X	X

#### BSA im 10d Embryo

Ordnung	MW	Stab	p-Wert im Vergleich zu Ordnung			
			1	2	3	4
0	0,40	0,39	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1	0,83	0,36	X	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	1,08	0,32	X	X	0,003	<0,001
3	1,35	0,57	X	X	X	0,326
4	1,49	0,34	X	X	X	X

#### BSA im 17d Embryo

Ordnung	MW	Stab	p-Wert im Vergleich zu Ordnung			
			1	2	3	4
0	0,50	0,29	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1	0,89	0,30	X	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	1,18	0,38	X	X	0,009	0,001
3	1,40	0,48	X	X	X	0,058
4	1,68	0,69	X	X	X	X

Tabelle 3 : Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stab) der beschichteten Partikel.  
(Geschwindigkeit in mm/s).

Außerdem Vergleich der p-Werte aller Ordnungen untereinander am jeweiligen Entwicklungstag.

## 4. Ergebnisse

### Vergleich der Flußgeschwindigkeiten in jeder Ordnung

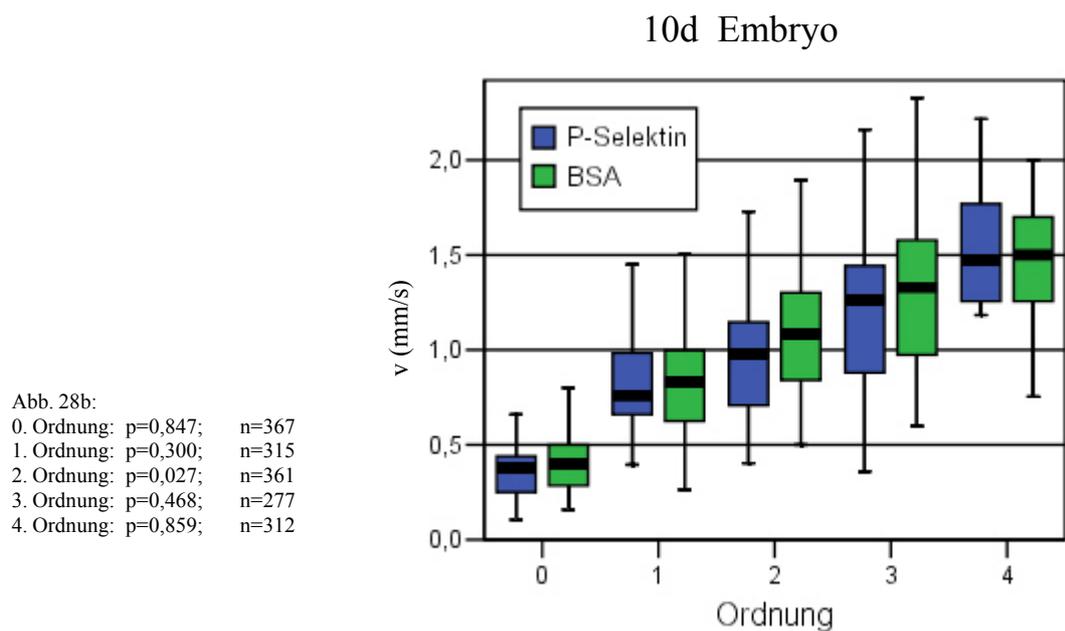
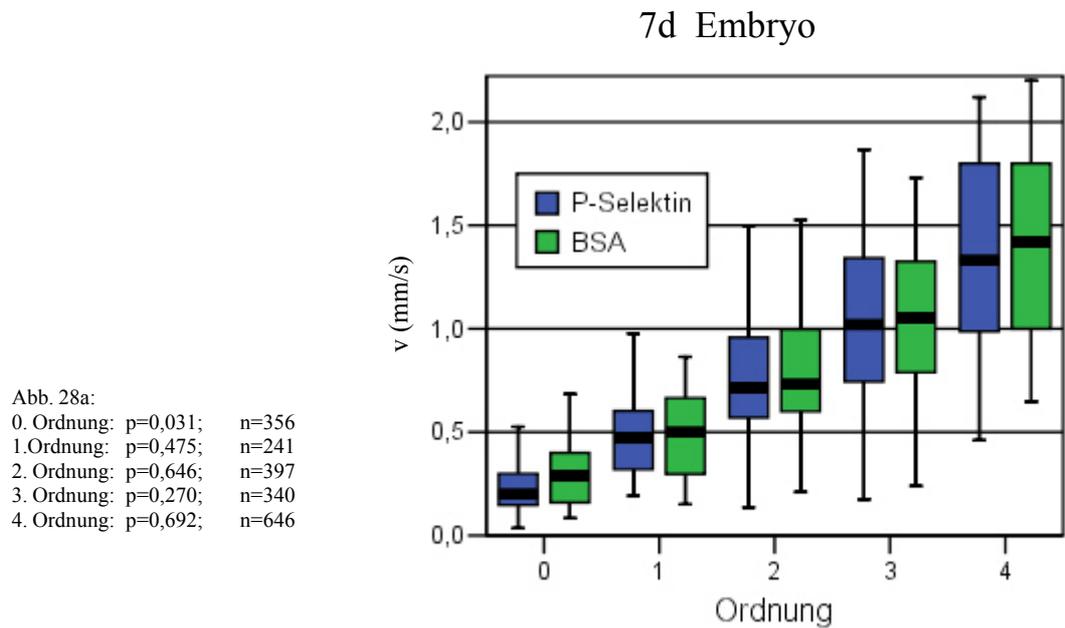


Abb. 28a-c:  
Vergleich der Flußgeschwindigkeiten mit Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung aller Gefäßordnungen im 7, 10 und 17 Tage alten Hühnerembryo. Diagramme als Boxplot.

## 4. Ergebnisse

### 17d Embryo

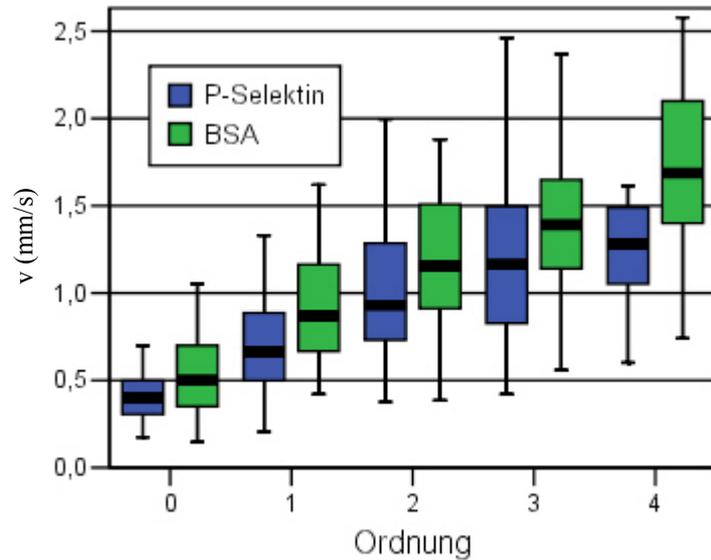


Abb. 28c:

0. Ordnung:  $p=0,024$ ;  $n=376$   
1. Ordnung:  $p=0,006$ ;  $n=319$   
2. Ordnung:  $p<0,001$ ;  $n=408$   
3. Ordnung:  $p=0,009$ ;  $n=423$   
4. Ordnung:  $p=0,012$ ;  $n=401$

#### 4.4 Injektion von hühnereigenen Leukozyten

Die Hühnerleukozyten ließen sich präparieren, isolieren und durch die Behandlung mit Calcein-AM-Ester™ fluoreszent machen. Sie waren dadurch im Stereomikroskop gut sichtbar. Die Injektion der fluoreszierenden Hühnerleukozyten gelang ebenfalls (Abb. 29). Im Gegensatz zu CHO- und U937-Zellen kam es zu keinem Adhäsionsverhalten. Sie eignen sich daher für weitergehende Geschwindigkeitsanalysen.

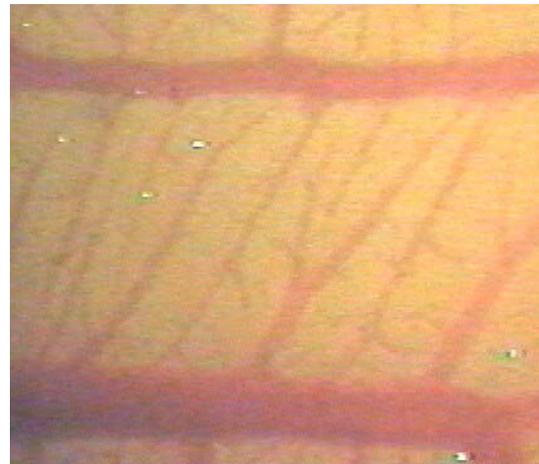


Abb. 29: fluoreszierende Hühnerleukozyten im 17d Embryo. Alle Leukozyten bewegen sich intravasal. Eigene Aufnahme, Vergr.  $\times 20$

#### 4.5 Fotoserie

Die Fotoserie mit Darstellung der Hühnerembryos zu den jeweiligen Entwicklungsstadien und deren CAM sowie das zugeordnete Stadium nach Hamburger-Hamilton ist im Fotoatlas (Abb. 41 - 61, Seiten 69 - 78) dargestellt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Kultivierungsmethoden

Die in ovo Methode mit einfacher Fensterung hat den Vorteil der längsten Lebensdauer der Embryos, jedoch folgende Nachteile:

- schlechter Kontrast im Mikroskop
- schwierige Injektion (Gefäße rutschen leicht weg, ungünstige Injektionswinkel)
- schlechter Überblick über das Gefäßsystem des Embryos (Sicht nur in Fenstergröße, größer werdender Embryo verdrängt Gefäße aus dem Sichtbereich).

Um das Problem des schlechten Kontrastes zu lösen, wurde die doppelt gefensterte in ovo Methode getestet. Durch die guten Beleuchtungsverhältnisse (Licht kommt zusätzlich von unten an die CAM) ergab sich ein verbesserter Kontrast. Aufgrund folgender Nachteile war diese Methode ebenfalls ungeeignet:

- sehr aufwendig (dichter, aber zugleich lichtdurchlässiger Verschluss am unteren Fenster notwendig )
- trotz in ovo Wachstum nur kurze Lebensdauer (5 - 6 Tage)
- wie bei der einfach gefensterten in ovo Methode auch schwierige Injektion und schlechter Überblick über das Gefäßsystem

Zur Verbesserung der Übersicht über das Gefäßsystem bei ausreichender Überlebensrate wurden die Eier mit der „Spiegeleimethode“ (Auerbach et al., 1974) kultiviert, mit eindeutigen Vorteilen:

- gute Bilder im Mikroskop und auf Video
- gute Übersicht über Embryo und Gefäßsystem
- bei Benutzung geeigneter Gefäße gute Injektionsbedingungen

Um die Überlebensraten zu steigern, wurden die in der Literatur beschriebenen Methoden (Auerbach et al., 1974; Narbaitz und Jande, 1978; Dunn und Fitzharris, 1979; Schlatter et al., 1997) auf unsere Bedürfnisse hin modifiziert:

- für eventuell entstehenden Kalziummangel (Tuan und Nguyen, 1987) wurde Eischalengranulat mit in die Glasschale gegeben

## 5. Diskussion

- um ein mögliches Austrocknen der Embryos zu verhindern, wurden sie am 5. Tag mit je 5 ml Ringerlactatlösung überschichtet
- infektiionsprophylaktisch wurden verschiedene Antibiotika zugegeben

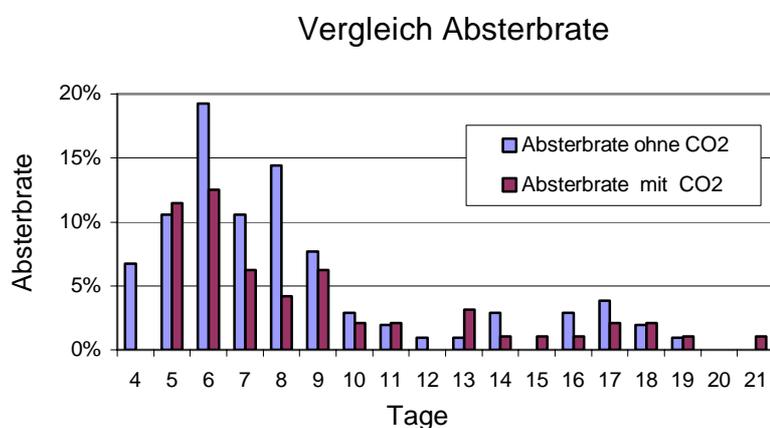
Am besten eigneten sich Waageschälchen als Behälter. Einige Embryos wurden 15 Tage und älter. Diese Überlebensraten waren notwendig, um genügend Versuche durchführen zu können. Deshalb wurde für die *in vivo* Mikroskopie diese Kultivierungsmethode gewählt, sie vereinigte in sich alle untenstehenden Vorteile und ist damit den anderen Verfahrensweisen vorzuziehen:

- lange Lebensdauer des Embryos
- gute Injektionsvoraussetzungen
- gute Sichtverhältnisse / guter Überblick

Weitere Maßnahmen zielten darauf ab, die Überlebensquote der Embryos zu erhöhen. Es stellte sich heraus, daß sich der Einfluß von 1,5% CO<sub>2</sub> im Inkubator positiv auf die Lebensdauer der Embryos auswirkte.

Zur Darstellung der Überlebensraten in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Inkubation wurden die Absterbraten ermittelt. Es wurde das Verhältnis der natürlich gestorbenen zu den am Vortag lebenden Embryos (abzüglich den Embryos, an denen Versuche durchgeführt wurden) ermittelt (Abb. 30). Dadurch gibt die Absterbrate genau den Prozentsatz der natürlich gestorbenen Embryos unabhängig von der Anzahl und dem Zeitpunkt der durchgeführten Versuche an. Da dabei immer nur ein bestimmter Tag betrachtet wird, lassen sich die Raten nicht direkt vergleichen, weil die vorher gestorbenen Embryos bereits fehlen.

Abb. 30  
Vergleich der Absterbraten ohne (blauer Balken) und mit 1,5% CO<sub>2</sub> (roter Balken) Inkubation. Die Absterbrate ist nur für den jeweiligen Tag dargestellt.



## 5. Diskussion

Zur besseren Darstellung und Auswertung wurden deswegen die Absterbraten der einzelnen Tage addiert (s. Abb. 23, S. 34). Dieses Diagramm eignet sich am besten zur Beurteilung der Kultivierungseinflüsse auf die Überlebenszeit.

Beim Vergleich der Kultivierungsmethoden fiel eine sichtbare Retardierung der schalenlosen Kultur gegenüber der normal beschriebenen Entwicklung im Ei auf. Zwischen dem 6. und 10. Tag war die Mehrzahl der Embryos um 0,5 Tage unterentwickelt, bis zum 16. Tag betrug der Rückstand ca. 1 Tag und am 21. Tag betrug der Rückstand 1,5 Tage. Dadurch ist es auch zu erklären, daß die Embryos teilweise 22,5 Tage alt wurden. Höhere Überlebensraten konnten nicht erzielt werden. Die Unterschiede wurden durch Vergleiche der äußeren Merkmale mit der vorhandenen Literatur (Hamburger und Hamilton, 1951) visuell erfaßt und bei der Ergebnisbetrachtung mit berücksichtigt.

### **5.2 Induktion von Entzündungen**

Durch die hier vorgelegte Arbeit sind die Voraussetzungen zur Untersuchung einer induzierten Entzündung, z.B. durch lokale Applikation von LPS, gegeben. Das entwickelte Modell sowie die Injektionsmethoden sind als Voraussetzung für erfolgreiche Experimente zu werten. Vor allem sollte der Möglichkeit nachgegangen werden, beschichtete Partikel oder hühnereigene Leukozyten zu injizieren und ein gerichtetes Einwandern in die entzündeten Bereiche zu verfolgen.

### **5.3 Injektionstechnik**

#### **5.3.1 Mikro-/Makroinjektion**

Die von uns entwickelte Technik der Mikroinjektion eignete sich gut für ein präzises injizieren, besonders bis zum 10. Entwicklungstag. Durch Einstellungen am Mikroinjektor sowie die manuelle Steuerung der Injektionsmenge (Anzahl der Injektionen) konnte unter visueller Kontrolle im Stereomikroskop eine exakte Objektmenge injiziert werden. Limitierend für die Mikroinjektion nach dem 10. Tag waren jedoch folgende Faktoren:

Die Stärke der Gefäßwände nimmt mit zunehmendem Alter der Embryos stetig zu. Auch befinden sich ab dem 10. Tag nur noch feine Kapillargefäße oder Venen

## 5. Diskussion

1. Ordnung direkt an der CAM-Oberfläche. Die Venen der 2. oder 3. Ordnung, welche für die Mikroinjektion am besten geeignet sind, verlaufen tiefer und sind freier beweglich als an der Oberfläche. (s. 2.5 Gefäßentwicklung, S. 14; Abb. 9, S. 12; Abb. 10, S. 14). Ab diesem Tag läßt auch die Oberflächenspannung der CAM nach, was ein Durchstechen der obersten Schichten mit der Injektionskanüle erschwert. Obwohl vereinzelte Mikroinjektionen gelangen, konnte aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten keine ausreichende Anzahl von erfolgreichen Versuchen unternommen werden. Deshalb wurde ab dem 14. Tag die Makroinjektion durchgeführt. Es konnten größere Gefäße angestochen werden, und der größere Kanülendurchmesser erlaubte ein ungehindertes Durchfließen der Injektionssubstanzen. Dadurch konnte auch eine höhere Konzentration als bei der Mikroinjektion gewählt werden. Gelang die Injektion, konnte innerhalb kürzester Zeit eine ausreichende Menge an Zellen injiziert werden. Beachtet werden mußte jedoch, daß sich die Injektionsmenge nicht so genau steuern ließ wie bei der Mikroinjektion.

Bedingungen für die Makroinjektion waren zum Einen das Vorhandensein genügend großer Venen 4.-5. Ordnung (0,5 mm), da die Kanüle auch einen großen Eigendurchmesser (0,4 mm) hat, zum Anderen mußte der Embryo kräftig genug sein, die Injektion zu überleben (Der Blutverlust bei der Makroinjektion war wesentlich größer als bei der Mikroinjektion).

Diese Bedingungen waren in der Regel ab dem 14. Tag gegeben, weshalb die Makroinjektion hauptsächlich ab diesem Entwicklungsstand durchgeführt wurde.

### 5.3.2 Kanülenherstellung

Bei der Kanülenherstellung mußte ein Kompromiß zwischen den folgenden zwei Faktoren gefunden werden:

- kleinstmögliche Kanülenspitze für ein möglichst atraumatisches Anstechen der Blutgefäße, bei zu großer Kanülenspitze ist die Injektion unmöglich (weggleiten oder Ruptur der Gefäße)
- größtmöglicher Innendurchmesser der Kanülenspitze, um einen ungehinderten Durchfluß der Injektionssubstanzen zu gewährleisten.

Das Herstellen von sehr kleinen Kanülenspitzen mit einem Außendurchmesser von  $<10\ \mu\text{m}$  (Rizzo et al., 1993) war technisch durchaus durchführbar (bis 500 nm), jedoch zeigten viele Versuche mit den unterschiedlichsten Objekten, daß der

## 5. Diskussion

minimale Innendurchmesser für die Versuche dieser Arbeit mindestens 20 - 80  $\mu\text{m}$  (je nach Objekt  $\rightarrow$  Verstopfungsgefahr! ) betragen mußte. Auch das Alter der Embryos spielte eine Rolle. Konnten bei den 4-7-tägigen Embryos noch etwas größere Kanülenöffnungen verwendet werden, mußten diese ab dem 8. Tag aufgrund der sich entwickelnden stärkeren Gefäßwände extrem klein gehalten werden.

### 5.4 Injektion von Objekten

Die injizierten Objekte sollten für die Injektion zwar kleinstmöglich sein, jedoch möglichst auch der natürlichen Größe der Hühnerleukozyten (5-10  $\mu\text{m}$ ) nahekommen. Auch durften die Modellzellen kein zu großes Adhäsionsverhalten aufweisen, da sich sonst bereits viele Zellen an der Kanülenwand anlagerten. Das größte Problem war jedoch die Verklumpung untereinander. Bildete sich ein Komplex mit mehr als 3 Zellen (CHO, U937), verstopfte die Kanülenspitze und die Injektion mußte abgebrochen werden.

Um die Zellen reproduzierbar zu beobachten, erwies es sich als vorteilhaft, fluoreszierende Substanzen zu verwenden. So konnte man sie unter UV-Licht und einem geeigneten Filter nicht nur unterm Mikroskop, sondern auch während der Videoauswertung eindeutig von den hühnereigenen Zellen unterscheiden.

#### 5.4.1 Injektion von Fluoreszenzpartikeln

Die Fluoreszenzpartikel erwiesen sich als die geeignetsten Substanzen zur Injektion. Aufgrund ihrer geringen Größe (2,2  $\mu\text{m}$ ) und ihrer Eigenschaft, nicht zu verklumpen, konnten kleinste Kanülenspitzeninnendurchmesser gewählt werden (20  $\mu\text{m}$ ). Dadurch war es möglich, zu Zeitpunkten aller Entwicklungsstadien zu injizieren. Auch konnten sie ständig der Stammlösung entnommen werden und mußten nicht für jeden Versuch extra hergestellt werden. Da sie aber keine Adhäsionsmoleküle enthielten, deren Verhalten untersucht werden sollte (Selektine), eignete sich die Verwendung der Partikel vor allem zum Testen des Versuchsaufbaus und zur Darstellung des Blutkreislaufsystems.

#### 5.4.2 Injektion von CHO/CHO-E Zellen

Diese Zellen standen im Institut zur Verfügung und wurden in vielen in vitro Modellen bereits getestet. Jetzt sollte im in vivo Modell die Wechselwirkung der Selektinmoleküle mit der Blutgefäßwand untersucht werden. Die durchschnittliche

## 5. Diskussion

Größe der CHO-Zellen ( $10\ \mu\text{m}$ ) ähnelt der der pseudoeosinophilen Granulozyten des Huhnes. Durch Expression von E-Selektin auf Ihrer Oberfläche (CHO-E Zellen) wurde das Zellrollverhalten der CHO-E Zellen (mit Selektin) mit dem der CHO-Zellen ohne Selektin (Negativkontrolle) verglichen. Befinden sich Selektinliganden an den Blutgefäßwänden, müßte es zu einer deutlichen Verlangsamung der Durchschnittsgeschwindigkeit der CHO-E Zellen kommen. Durch Beladung der Zellen mit Calcein-AM-Ester™ fluoreszierten die Zellen im Mikroskop unter UV-Licht. Ebenso wurde versucht, durch Transfektion mit GFP die Zellen dauerhaft fluoreszent zu machen (t-CHO). Die verwendete Methode erwies sich dafür als sehr gut geeignet. Dadurch standen ständig Zellen zur Verfügung, die ohne weitere Behandlung unter UV-Licht fluoreszierten.

Der größte Nachteil bei der Verwendung der CHO/t-CHO Zellen war Ihr starkes Adhäsionsverhalten. Viele Zellen hafteten bereits an der Injektionskanülenwand und standen daher für die Injektion nicht mehr zur Verfügung. Wurde die Konzentration erhöht, verklumpten die Zellen untereinander und verstopften die Kanülenspitze. Einer größeren Kanülenöffnung ( $> 80\ \mu\text{m}$ ) waren jedoch die oben beschriebenen Grenzen gesetzt (Gefäßruptur, Gefäß nicht mehr anstechbar).

Das Problem der Adhärenz wurde wie folgt zu lösen versucht:

- schnelle Injektion (nach Laden der Kanüle baldmöglichste Injektion)
- erhöhter Injektionsdruck ( $p = 700\ \text{hPa}$ ) bei gleichbleibender Injektionszeit

Gelang die Injektion, adhärten die Zellen nach einigen Umläufen im Gefäßsystem und im Embryo. Bereits nach einigen Sekunden waren fast keine frei beweglichen Zellen mehr in der Blutbahn zu sehen (Abb. 31).

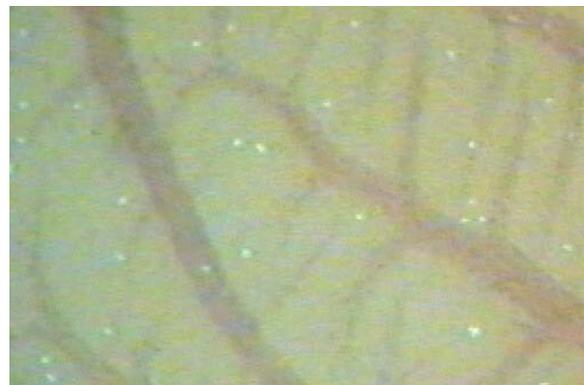


Abb. 31:  
Adhärierende CHO-E-Zellen.  
Zustand 20 s nach Makroinjektion  
der CHO-E-Zellen in einen 17d  
Embryo. Fast sämtliche Zellen sind  
am Gefäßendothel. adhärnt.  
(Eigene Aufnahme, Vergr.  $\times 32$ )

Für eine exakte Messung der Durchschnittsgeschwindigkeit reichte die Menge der beobachteten Zellen pro Embryo nicht aus. Beachtet werden mußte auch, daß bei der

## 5. Diskussion

gewählten Vergrößerung nur ein kleiner Teil des Blutgefäßsystems im Mikroskop zu sehen war, und daß oft gerade dieser Bereich nicht von Zellen passiert wurde. Zusammenfassend kann man sagen, daß sich das entwickelte Injektionsmodell als brauchbar erwies, fluoreszenzmarkierte CHO-/CHO-E Zellen zu injizieren. Das gilt für beide Injektionsarten. Das Verhalten der Zellen im embryonalen Blutkreislauf ließ jedoch keine eindeutigen Auswertungen sowie Aussagen über ein mögliches Rollverhalten der CHO-E/t-CHO-E Zellen zu.

### 5.4.3 Injektion von U937-Zellen

Um das Problem der Adhärenz der CHO-Zellen zu lösen, wurden einige Versuche mit U937-Zellen unternommen. Ihre Größe von 10 µm entsprach wie die der CHO-Zellen ungefähr der der Pseudoeosinophilen des Huhnes. Als funktionelle Gruppe exprimieren sie den P-Selektinliganden PSGL-1, welcher an vorhandene Selektinrezeptoren binden kann. Auch hier erwies sich das Injektionsmodell als geeignet, sowohl per Mikro- als auch per Makroinjektion U937-Zellen in den Blutkreislauf zu injizieren. Die Versuchsauswertung zeigte jedoch, daß die U937-Zellen ebenfalls wie die CHO-Zellen bereits nach wenigen Sekunden in den Kapillargefäßen hängenblieben und sich somit für eine größer angelegte Versuchsreihe nicht eigneten (s. Abb. 24 Seite 34). Auch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß beide Zellarten aufgrund Ihres Adhäsionsverhaltens am Gefäßendothel festklebten. Eine Extravasation der Zellen wurde lichtmikroskopisch nicht beobachtet. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß ein Teil der Zellen vom phagozytotischem System (Leber, Milz) zurückgehalten wurde. Ob dies tatsächlich der Fall war, ist für die vorliegende Arbeit ohne Bedeutung. Deswegen wurden auch keine weitergehenden Untersuchungen unternommen.

### 5.4.4 Injektion beschichteter Partikel

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten wurde auf die bereits erprobten FITC-Partikel zurückgegriffen. Sie standen in ausreichender Anzahl zur Verfügung, sind hochfluoreszent und homogen ( $\varnothing 2,2\mu\text{m}$ ). Da es gelang, die Partikel mit Selektin zu beschichten, konnten erstmalig die Vorzüge der guten Injektionsbedingung durch die kleinen, nicht so schnell adhärierenden und verklumpenden Partikel sowie die Möglichkeit, das Verhalten der „Modellzellen“ mit exprimierten Adhäsionsrezeptoren zu untersuchen, kombiniert werden. Nach der Injektion

## 5. Diskussion

zirkulierten die beschichteten Partikel mehrere Minuten im Blutkreislaufsystem. So konnten während der Aufzeichnung in einem kleinen Blickfeld viele Partikel erfaßt und ausgewertet werden (Abb. 32). Aufgrund dieser optimalen Voraussetzungen wurden die selektiv beschichteten Partikel verwendet, um die Hauptversuche durchzuführen. Die Injektionszeitpunkte wurden so gewählt, daß zum Einen die Mikroinjektion gut gelang (6./7. Tag bzw. 9./10. Tag), zum Anderen mittels Makroinjektion (16./17. Tag) Versuche auch in älteren Embryos durchgeführt werden konnten.

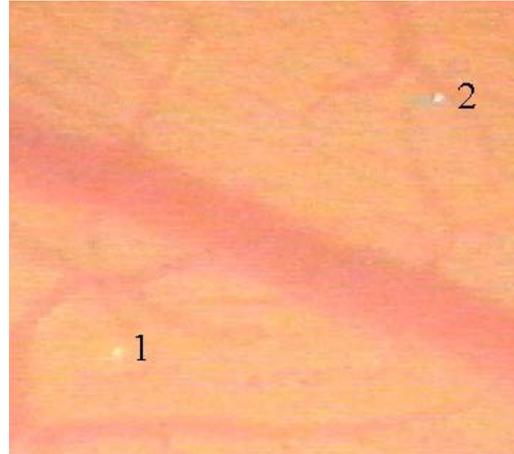


Abb. 32: Mit P-Selektin beschichtete Partikel im 17 d Embryo nach erfolgreicher Makroinjektion.

Beide Partikel bewegen sich intravasal.

1 = Partikel im Kapillargefäß

2 = Partikel im Gefäß 2. Ordnung

Eigene Aufnahme, Vergr. x40

### 5.4.5 Injektion hühnereigener Leukozyten

Da die Entnahme und Isolierung/Aufbewahrung von Leukozyten von adulten Hühnern sehr aufwendig ist, wurden diese Versuche erst durchgeführt, nachdem sich die Injektion mit beschichteten Partikeln bewährt hatte. Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Säugerzelllinien ließen sich Hühnerleukozyten gut injizieren (s. Abb. 29, S.40). Ein weiterer Vorteil war, daß diese Zellen Selektinliganden bzw. -rezeptoren exprimieren (Plugge EM, 2004). Sie sollten somit geeignet sein, natürlicherweise in Wechselwirkung zum Gefäßendothel zu treten. So könnte neben dem normalen Zellrollverhalten auch das Verhalten an lokalen Entzündungsbereichen untersucht werden.

## 5.5 Auswertung

### 5.5.1 Videoauswertung

Die Geschwindigkeitsbestimmung der Zellen mittels Videokinematografie ähnlich der Methode von Ellis et al., 1987, erwies sich im Gegensatz zur Aufzeichnung auf Festplatte als die geeignetere Methode, größere Datenmengen auszuwerten. Bei Festplattenaufzeichnung mußte die aufzunehmende Sequenz zuerst als avi-Datei (digitale Videodatei) gespeichert werden. Aufgrund der anfallenden riesigen Daten-

## 5. Diskussion

mengen spielten die Hardwareressourcen des Computers eine limitierende Rolle. Ebenso erreichte die Qualität der Festplattenaufzeichnung nicht die der Videoaufzeichnung. Bei vielen bereits etablierten Möglichkeiten zur Blutflußmessung mittels Doppler-Ultraschall, konventionelle Angiographie (Manning et al., 1993), Laser-Doppler-Flußmessung (LDF), Magnet-Resonanz Angiographie (Manning et al., 1993) oder mit der neulich beschriebenen Optischen-Doppler-Tomographie (Chen et al., 1998) kann der Blutfluß im Untersuchungsgebiet exakt bestimmt

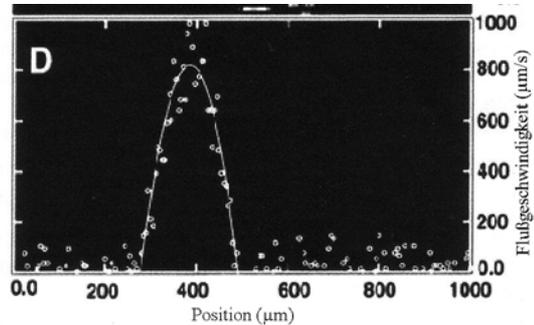


Abb.33:  
Bestimmung der Blutflußgeschwindigkeit mittels Optischer Doppler-Tomografie durch eine Venole (Chen et al., 1998).

werden (Abb. 33), eine Fokussierung auf sich bewegende Einzelobjekte, gegebenenfalls deren Selektion und Geschwindigkeitsbestimmung ist jedoch nicht möglich.

Die Möglichkeit der computergestützten Geschwindigkeitsbestimmung der aufgezeichneten Objekte (Meuer HJ, 1992) schied wegen der fehlenden technischen Voraussetzungen aus. Da bei den durchgeführten Experimenten eine riesige Anzahl an auszuwertenden Sequenzen anfiel (enormer zeitlicher Aufwand), sollte diese Möglichkeit in Zukunft in Betracht gezogen werden.

### 5.5.2 Möglichkeiten des Vergleiches

Da sowohl die Kontroll- als auch die selektintragenden Partikel stark grün fluoreszierten, konnte je Embryo immer nur eine Substanz injiziert werden (keine Möglichkeit zur Parallelverfolgung). Dies erschwerte den direkten Vergleich der Flußgeschwindigkeiten. Der Versuch, die Kontrollpartikel/-zellen rot fluoreszent zu markieren scheiterte an der ungenügenden Fluoreszenzintensität sowie dem Fehlen der geeigneten Filter. Um das Problem zu lösen, wurde sowohl in der Kontroll- als auch in der Untersuchungsgruppe eine große Anzahl von Partikeln für die jeweiligen Geschwindigkeitsbestimmungen herangezogen. Da insgesamt tausende Einzelpartikel ausgewertet wurden, können die in den Abb. 34-36 (S. 51-53) dargestellten Werte als verlässliche Durchschnittswerte angenommen werden.

### 5.6 Diskussion der Durchflußgeschwindigkeit

Beim gleichaltrigen Embryo nahm die Geschwindigkeit sowohl bei den mit Selektin- als auch mit BSA-beschichteten Partikeln von der 0. bis zur 4. Ordnung wie erwartet meist hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) zu, mit Ausnahme des Vergleiches der 3. mit der 4. Ordnung im 10- und 17 d Embryo (s. Tabelle 3, Seite 38). Während bei den mit BSA-beschichteten Partikeln sich die Geschwindigkeit in jeder Ordnung vom 7. bis zum 10. Entwicklungstag des Embryos ebenfalls meist signifikant erhöhte (Tabelle 4, S. 64), nahm sie vom 10. bis zum 17. Entwicklungstag kaum noch zu (nicht mehr signifikant). Daraus läßt sich schließen, daß sich die Hämodynamik in den Blutgefäßen aller untersuchten Ordnungen ab diesem Zeitpunkt nicht mehr ändert. Ähnlich verhalten sich die Geschwindigkeiten der mit Selektin beschichteten Partikel (Tabelle 4, S. 64), jedoch mit dem Unterschied, daß sich zwischen dem 10. und 17. Entwicklungstag die Geschwindigkeiten leicht verringerten. Die Gründe hierzu werden beim direkten Vergleich Selektin-BSA noch genauer erläutert.

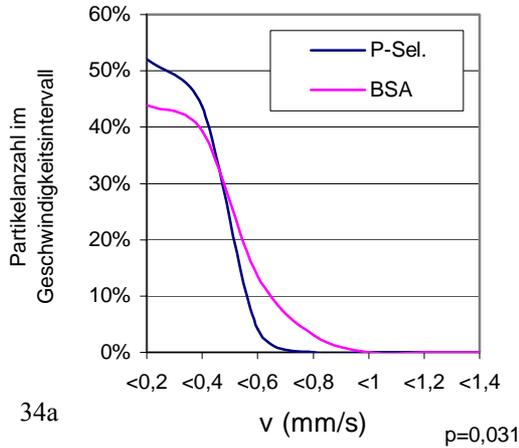
#### 5.6.1 Vergleich zwischen P-Selektin und BSA - beschichteter Partikel

Die Geschwindigkeiten in allen untersuchten Ordnungen am 7. und 10. Tag sowohl der BSA- als auch der selektinbeschichteten Partikel unterschieden sich nur gering (nicht signifikant, s. Abb. 26, 27, 34, 35). Jedoch in der 0. Ordnung am 7. Tag ( $p = 0,031$ , s. Abb. 34a) und der 2. Ordnung am 10. Tag ( $p = 0,027$ , s. Abb. 35c) waren die Werte für die mit Selektin beschichteten Partikel signifikant niedriger.

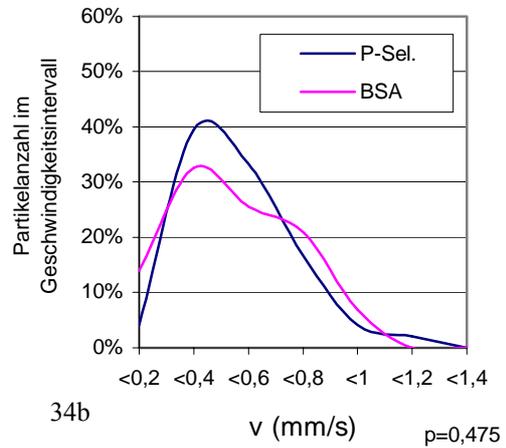
Es kann daher angenommen werden, daß Selektine respektive deren Liganden bereits am 7. Tag im Hühnerembryo vorkommen. Zwischen dem 10. und dem 14. Entwicklungstag spielt sLe<sup>x</sup> bei der B-Zell Reifung in der Bursa Fabricius eine wichtige Rolle (Masteller et al., 1995). Der Vergleich der 2. Ordnung am 10. Tag ist ein weiterer Hinweis dafür, daß zu diesem Zeitpunkt bereits Selektine vorhanden sind (Abb. 27c). Neuere Arbeiten (Plugge EM, 2004) bestätigen ebenfalls diese Vermutung. So konnte mittels in situ Hybridisierung bereits im 9 d Embryo m-RNS von P-Selektin nachgewiesen werden. Laut dieser Arbeit wird angenommen, daß E- und P-Selektin bevorzugt im Knochen, vornehmlich im Knochenmark, exprimiert werden. Dies könnte mit der blutbildenden Funktion des Knochenmarks zusammenhängen, da hier vor allem die hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden.

Vergleich der einzelnen Ordnungen  
im gleichaltrigen Embryo (7d)

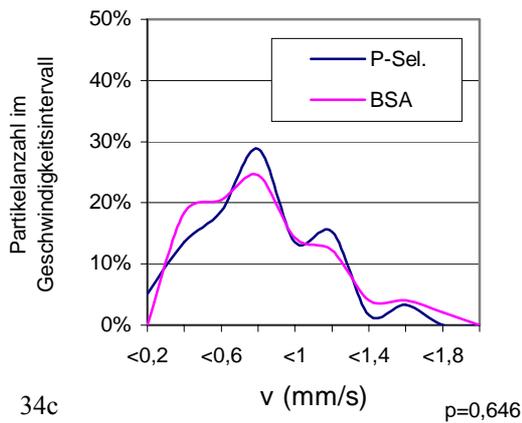
**Vergleich P-Selektin / BSA**  
7d Embryo 0. Ordnung



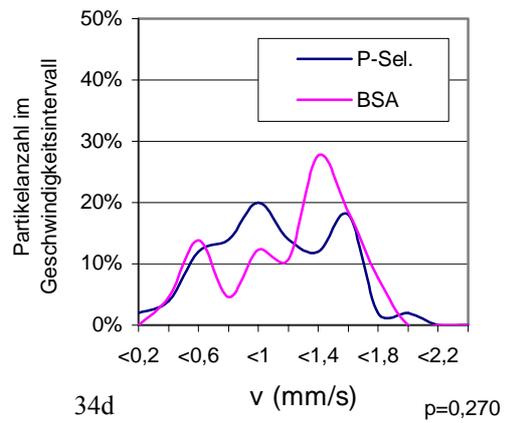
**Vergleich P-Selektin / BSA**  
7d Embryo 1. Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
7d Embryo 2. Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
7d Embryo 3. Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
7d Embryo 4. Ordnung

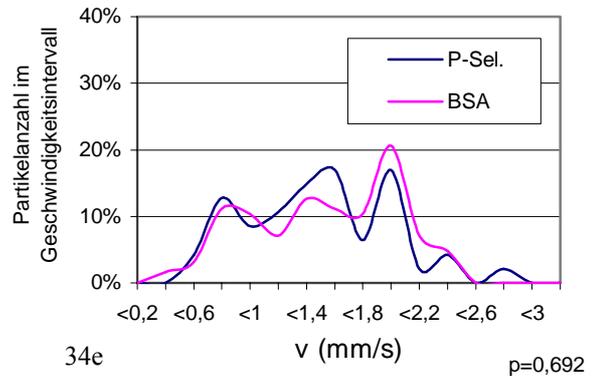
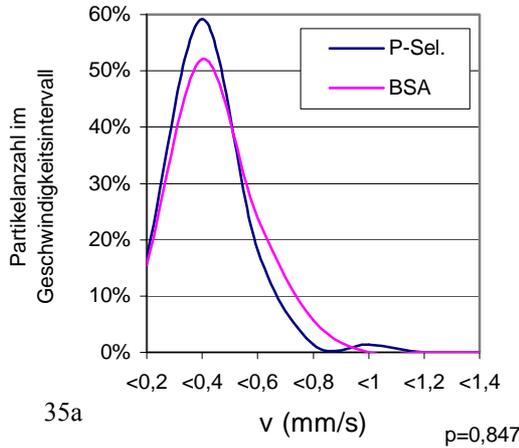


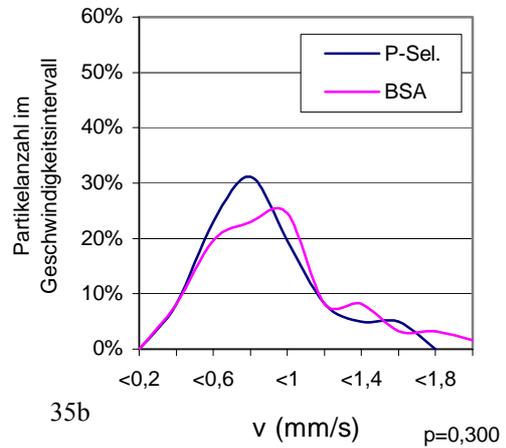
Abb. 34a-e: Direkter Vergleich der mit Selektin (P-Sel., blaue Linie) bzw. mit BSA (violette Linie) beschichteten Partikel im 7d Embryo in jeder Gefäßordnung.

Vergleich der einzelnen Ordnungen  
im gleichaltrigen Embryo (10d)

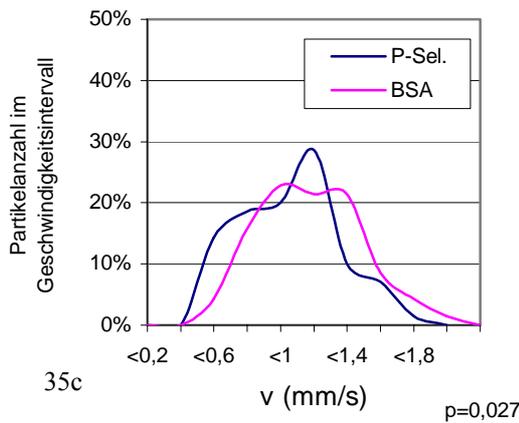
**Vergleich P-Selektin / BSA**  
10d Embryo 0. Ordnung



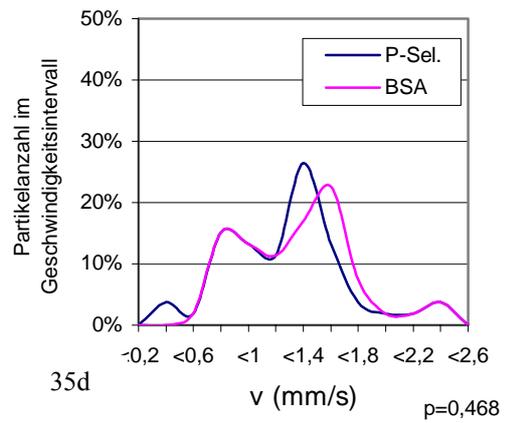
**Vergleich P-Selektin / BSA**  
10d Embryo 1. Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
10d Embryo 2. Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
10d Embryo 3. Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
10d Embryo 4. Ordnung

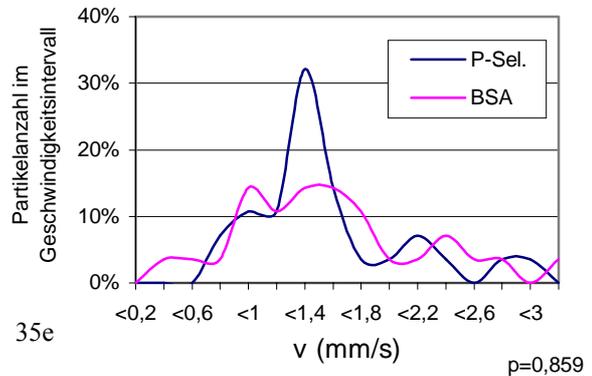
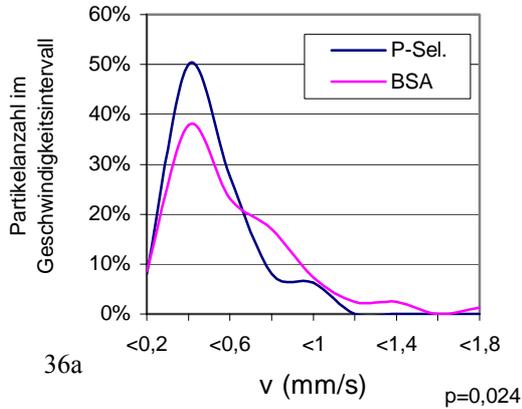


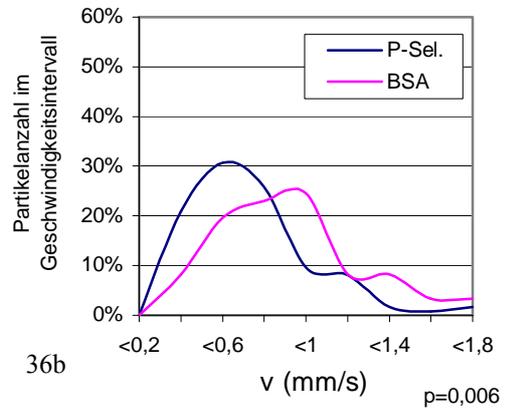
Abb. 35a-e: Direkter Vergleich der mit Selektin (P-Sel., blaue Linie) bzw. mit BSA (violette Linie) beschichteten Partikel im 10d Embryo in jeder Gefäßordnung.

**Vergleich der einzelnen Ordnungen**  
im gleichaltrigen Embryo (17d)

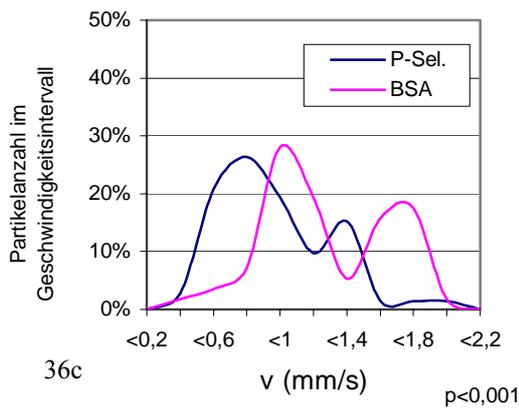
**Vergleich P-Selektin / BSA**  
17d Embryo 0.Ordnung



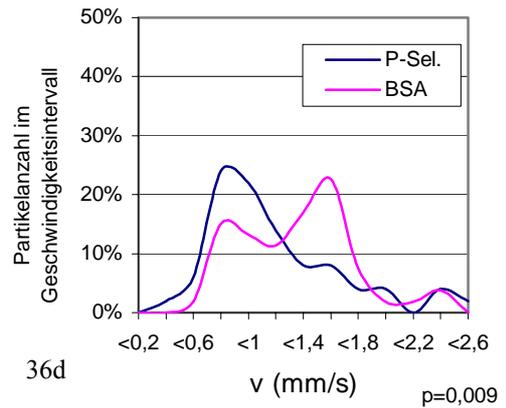
**Vergleich P-Selektin / BSA**  
17d Embryo 1.Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
17d Embryo 2.Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
17d Embryo 3.Ordnung



**Vergleich P-Selektin / BSA**  
17d Embryo 4.Ordnung

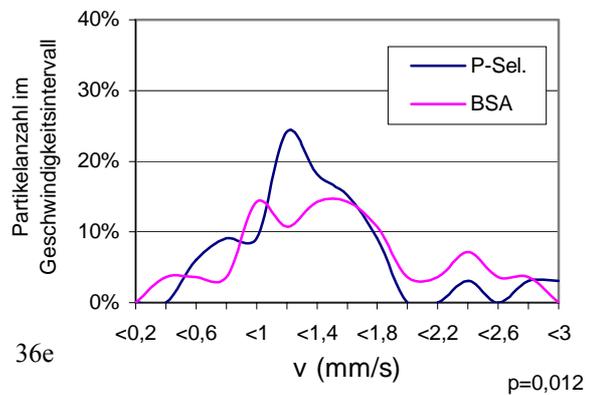


Abb.36a-e: Direkter Vergleich der mit Selektin (P-Sel., blaue Linie) bzw. mit BSA (violette Linie) beschichteten Partikel im 17d Embryo in jeder Gefäßordnung.

## 5. Diskussion

B-Zellen exprimieren vor ihrer Reifung in der Bursa Fabricius das Kohlenhydrat-Epitop sLe<sup>x</sup> und beginnen dann, das verwandte Kohlenhydrat-Epitop Lewis<sup>x</sup> zu exprimieren (Masteller et al., 1995). sLe<sup>x</sup> wurde bereits als ein Ligand der Selektinfamilie der Adhäsionsmoleküle beschrieben, welcher an der Migration und Rezirkulation von reifen Leukozyten in Säugern vorkommt (Varki A, 1994). Auch diese Erkenntnisse weisen, genau wie die Ergebnisse dieser Arbeit, auf das Vorhandensein von Selektinen bereits zu diesem Zeitpunkt hin.

Die größten Unterschiede bei den Rollgeschwindigkeiten zeigten sich beim Vergleich im 17 Tage alten Embryo. Dort war die Geschwindigkeit der P-Selektin-Partikel in den Gefäßen aller Ordnungen signifikant, in denen der 2. Ordnung sogar hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) erniedrigt (Abb. 36a-e). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß am 17. Entwicklungstag Liganden für P-Selektin in allen Ordnungen vorhanden sein müssen. Für deren Vorhandensein spricht auch die Tatsache, daß die Geschwindigkeiten außer in der 0. Ordnung vom 10. bis zum 17. Entwicklungstag leicht abnahmen, konträr dazu erhöhten sich die Werte bei der BSA-Kontrollgruppe. Unsere Befunde deuten auf das Vorhandensein von Selektinen und damit auch deren Liganden hin. Seit Abschluß der Experimente im Jahr 2002 wurde diese Ansicht durch weiterführende Arbeiten (Plugge EM, 2004) bestätigt. Es konnte mittels in situ Hybridisierung nachgewiesen werden, daß E- und P-Selektin in den Blutgefäßen von verschiedenen Organen (Knochenmark, Herz, Lunge, Leber, Dünndarm) vorkommen. Auch wird die Annahme durch Studien gestützt, welche die konstitutive Expression von E-Selektin und VCAM-1 in Endothelzellen von hämatopoetischen Geweben beschreiben (Schweitzer et al., 1996).

### **5.7 Eignung des Huhns als in vivo Modell für selektinvermittelte Leukozyten-adhäsion**

Da die physiologischen Abläufe im Huhn denen in Säugern stark ähneln, kann davon ausgegangen werden, daß sich der Hühnerembryo als Modellorganismus eignet. Unsere Befunde zeigen, daß selektinabhängige Unterschiede in der Rollgeschwindigkeit vorhanden sind. Jedoch muß beachtet werden, daß es Unterschiede gibt, z.B. liegt der Locus von den E-Selektin codierenden Genen (SELE) und der Locus von den Lymphotactin-codierenden Genen (SCYC1) in Maus und Mensch auf demselben Chromosom (jeweils Chromosom 1), bei Gallus gallus jedoch auf zwei

verschiedenen Chromosomen (SELE auf Chromosom 8, SCYC1 auf Chromosom 1) (Morroll et al., 2001).

### 5.8 Fotoatlas

Die in der Literatur allgemein akzeptierte Stadieneinteilung der Hühnerembryos nach Hamburger-Hamilton (Hamburger und Hamilton, 1951) beschreibt den Entwicklungszustand der Embryos nach äußeren und inneren Merkmalen. Die Methode hat den Vorteil, unabhängig von vielen Umwelteinflüssen, wie z.B. der Bebrütungs-temperatur, der Frische der Eier, der Temperatur der Eier bei Einbringen in den Inkubator und der Größe der Eier, daß sämtliche Embryos gleich weit entwickelt sind, unabhängig von ihrer bisherigen Inkubationszeit. Es kann jedoch die „Regelinkubationszeit“ angegeben werden. Die Entwicklung der CAM bleibt bei dieser Einteilung unberücksichtigt. Auch gibt es bisher keine Literatur, welche die Entwicklung der CAM im Vergleich zum Hamburger-Hamilton-Stadium beschreibt. Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte Fotoatlas (Abb. 41 - 61, S. 69-78) ordnet jedem Stadium von Hamburger-Hamilton die zugehörige CAM bei der Bebrütung in der Spiegeleikultur sowie der durchschnittlichen Inkubationszeit zu. Nach dem Ausprosseln der Dottergefäße begann die CAM zwischen dem 4. und 5. Bebrütungstag sichtbar zu wachsen. Am 9. Tag bedeckte sie bereits die gesamte Oberfläche der Waageschälchen. Ab dem 10. Tag hatte die CAM horizontal keinen Platz mehr, sich auszubreiten, es ließ sich nur noch ein Anstieg in der Komplexität erkennen und ein dreidimensionales Wachstum vermuten. Der kompletten Umrundung des Embryos durch die CAM war in der Spiegeleikultur aufgrund der fehlenden Gasaustauschfläche (seitlich und unten) Grenzen gesetzt, sie wurde auch nicht beobachtet.

Die Größe der CAM ist in den Abb. 46b - 50b (S. 71 - 73) durch einen schwarzen Kreis gekennzeichnet. Ab dem 10. Tag, an dem die CAM die gesamte Oberfläche bedeckte, wurde auf diese Kennzeichnung verzichtet. Der Embryo, welcher dem Hamburger-Hamilton-Stadium entsprach und in seinem Entwicklungsstadium lag, wurde zugehörig abgebildet. Dadurch wurde erstmals eine Übersicht erhalten, die den Embryo, die zugehörigen Stadien nach Hamburger-Hamilton sowie den Embryo in der Spiegeleikultur (in vivo) und seiner CAM mit der zugehörigen Einteilung nach Tagen zuordnet.

### 6 Zusammenfassung

Die Selektine gehören zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und spielen im Entzündungsprozeß sowohl im Säuger- als auch im Vogelorganismus eine bedeutende Rolle. Sie leiten das Leukozytenrollen zu Beginn der Adhäsionskaskade ein, bei der es zu einer rollenden und verlangsamten Bewegung der Leukozyten am Gefäßendothel und schließlich zu deren Extravasation in das entzündete Gewebe kommt. Für viele entzündliche Erkrankungen wie die myokardiale Ischämie oder die rheumatoide Arthritis wird eine Dysregulation der Selektinexpression mitverantwortlich gemacht. Aber auch bei der Atherosklerose als entzündlich fibrotische Antwort auf die Akkumulation von cholesterolreichen oxidierten Lipoproteinen in der Gefäßwand sowie bei diabetischen Gefäßschäden findet eine pathologische Überexpression von Selektinen statt. Beim LADS (Leukozyten Adhäsion Defizienz Syndrom) besteht ein angeborener Defekt der Adhäsionskaskade (Kugel et al., 2003). Während bei LAD Typ 1 die Integrinfamilie defekt ist, ist bei LAD Typ II das Selektinsystem betroffen (Etzioni und Tonetti, 2000). Neben verschiedenen wiederkehrenden bakteriellen Infektionen geht das Syndrom mit einer sehr aggressiv verlaufenden Parodontitis einher.

Therapieansätze bestehen zur Zeit in der Regulierung der Selektinexpression. Auch könnten Selektinantikörper als Arzneistoffvehikel fungieren. Dadurch kann der Wirkstoff direkt am Ort des Entzündungsgeschehens freigesetzt werden. Somit könnten auch für viele entzündliche Prozesse, auch im Bereich der Zahnmedizin (Parodontitis marginalis, Parodontitis apicalis, Lingua geografica, u.v.a.), neuartige Medikamente entwickelt werden. Da die Selektine auch einen wichtigen Faktor bei der Metastasierung von Krebs darstellen (Biancone et al., 1996), könnte die Behandlung vieler auch in der Mundhöhle vorkommender Karzinome (z.B. Plattenepithelkarzinom) unterstützt werden.

Bisher sind allerdings nur wenige Möglichkeiten zur in vivo Untersuchung der Wechselwirkung von Selektinen und deren Liganden bekannt. Die CAM des Hühnerembryos hat sich bereits für viele wissenschaftliche Versuche bewährt. Die Blutzirkulation im Hühnerembryo ist bis auf wenige Ausnahmen vergleichbar mit der des menschlichen Fetus. Auch die Blutflußgeschwindigkeiten liegen im physiologischen Bereich des Menschen. Es kann daher angenommen werden, daß

## 6. Zusammenfassung

unsere Beobachtungen und Meßergebnisse auch auf den Säugerorganismus zutreffen. Zu Beginn der Arbeit im Jahr 2000 war jedoch noch unklar, ob Selektine auch dort eine Rolle spielen. Neuere Untersuchungen (Plugge EM, 2004) sowie die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch auf das Vorhandensein von Selektinen bereits ab dem 7. Entwicklungstag hin. Das CAM-Modell wurde so auf unsere Bedürfnisse hin modifiziert, daß es gelang, verschiedene Objekte zu injizieren. Durch Fluoreszenzmarkierung (Transfektion bzw. Behandlung mit Calcein-AM-Ester™) konnten sie anschließend lichtmikroskopisch verfolgt und ausgewertet (Geschwindigkeitsbestimmung) werden. Bis zum 10. Entwicklungstag erwies sich die Mikro-, danach die Makroinjektion als am geeignetsten. Die besten Überlebensraten der Hühnerembryos wurden mit der Kultivierung nach der „Spiegeleimethode“ (Auerbach et al., 1974) bei einer rel. Luftfeuchte von 78% und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5% erzielt. Zur Darstellung des Blutkreislaufes, der Blutflußrichtung sowie zur Entwicklung der Injektionsmethoden wurden FITC-Partikel benutzt. Für die Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung wurden CHO-Zellen, CHO-E-Zellen (+E-Selektin), t-CHO-Zellen, t-CHO-E-Zellen, U937-Zellen sowie beschichtete Partikel (P-Selektin, BSA) verwendet. Durch die eigene Herstellung der Injektionskanülen konnten diese auf alle notwendigen Bedürfnisse der Injektionsobjekte (Innendurchmesser, Anschliffwinkel, Länge) individualisiert werden. Dadurch gelang die Mikroinjektion aller getesteten Objekte. Die CHO/E- und U937-Zellen ähneln der natürlichen Größe der Leukozyten (ca. 10 µm) am meisten. Trotz schwierig durchzuführender Injektion gelang es, eine ausreichende Menge an Zellen intravasal zu injizieren. Aufgrund des starken Adhäsionsverhaltens am Gefäßendothel waren bereits nach wenigen Sekunden keine Geschwindigkeitsbestimmungen mehr durchführbar. Deshalb wurde auf die bereits erprobten FITC-Partikel zurückgegriffen. Sie standen in ausreichender Anzahl zur Verfügung, sind hochfluoreszent und homogen (Ø 2,2 µm). Als es gelang, die Partikel mit Selektin zu beschichten, konnten erstmalig die Vorzüge der guten Injektionsbedingungen durch die kleinen, nicht so schnell adhärierenden und verklumpenden Partikel sowie die Möglichkeit, das Verhalten der „Modellzellen“ mit exprimierten Adhäsionsrezeptoren zu untersuchen, kombiniert werden. Als Kontrollgruppe wurden die Partikel mit BSA beschichtet.

Die Geschwindigkeiten der beschichteten Partikeln wurden von der 0. (Kapillargefäße) bis zur 4. Gefäßordnung (mittelgroße Venolen) bestimmt. Dabei wurden

## 6. Zusammenfassung

signifikant langsamere Geschwindigkeiten der mit P-Selektin gegenüber den mit BSA beschichteten Partikeln im 7 d alten Embryo in der 0. Ordnung ( $p=0,031$ ), im 10 d Embryo in der 2. Ordnung ( $p=0,027$ ) und im 17 d Embryo in allen Ordnungen ( $p<0,05$ ) gemessen. Der hochsignifikanteste Unterschied wurde am 17. Tag in der 2. Ordnung beobachtet ( $p<0,001$ ). Diese Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von Selektinen bereits ab dem 7. Entwicklungstag hin. Ab dem 17. Tag scheinen sie bereits eine bedeutende Rolle zu spielen.

Da die Entnahme und Isolierung/Aufbewahrung von Leukozyten von adulten Hühnern sehr aufwendig ist, wurden diese Versuche erst durchgeführt, nachdem sich die Injektion mit beschichteten Partikeln bewährt hatte. Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Säugerzelllinien ließen sich Hühnerleukozyten gut injizieren (s. Abb. 29, S. 40). Ein weiterer Vorteil war, daß diese Zellen Selektinliganden bzw. -rezeptoren exprimieren (Plugge EM, 2004). Sie sollten somit geeignet sein, natürlicherweise in Wechselwirkung zum Gefäßendothel zu treten. So könnte unter möglichst realen physiologischen Bedingungen neben dem normalen Zellrollverhalten auch das Verhalten an lokalen Entzündungsbereichen, z.B. durch lokale Applikation von LPS, untersucht werden.

Die Stadieneinteilung der Hühnerembryos nach Hamburger-Hamilton (Hamburger und Hamilton, 1951) beschreibt den Entwicklungszustand der Embryos nach äußeren und inneren Merkmalen. Die Entwicklung der CAM bleibt bei dieser Einteilung unberücksichtigt. Auch gibt es bisher keine Literatur, welche die Entwicklung der CAM bei der Kultivierung mit der „Spiegeleimethode“ (Auerbach et al., 1974) beschreibt. Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte Fotoatlas (Abb. 41 - 61, S. 69 - 78) ordnet erstmals jedem Stadium von Hamburger-Hamilton die zugehörige CAM bei der Bebrütung nach der „Spiegeleimethode“ sowie der durchschnittlichen Inkubationszeit zu. Der Embryo, welcher dem jeweiligen Hamburger-Hamilton-Stadium entspricht und dessen Entwicklung in der Regelzeit liegt, wird zugehörig abgebildet. Dadurch wird erstmals eine Übersicht erhalten, welche den Embryo, die zugeordneten Stadien nach Hamburger-Hamilton sowie den Embryo und dessen CAM in der Spiegeleikultur (in vivo) mit der dazugehörigen Einteilung nach Tagen zeigt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Andreasen** CB, Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Golden M, Brown J: Heterophil function in healthy chickens and in chickens with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Vet Pathol* 28 (1991) 419-427
- Asahara** T, Murohara T, Sullivan A: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (1997) 964-967
- Asahara** T, Masuda H, Takahashi T: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85 (1999) 221-228
- Auerbach** R, Kubai L, Knighton D, Folkman J: A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol* 41 (1974) 391-394
- Ausprunk** D, Knighton D, Folkman J: Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38 (1974) 237-249
- Baggiolini** M, Dewald B, Moser B: Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* 15 (1997) 675-705
- Barnhill** RL, Ryan J: Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *J invest Derm* 81 (1983) 485-488
- Barry** GH: Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, Georgia 30602, USA, 1998
- Bellaïrs** R, Osmond M: *The Atlas of Chick Development*. Academic Press, 1997
- Bendas** G: Selektine als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung. *Pharm Ztg* 46 (1999) 10-16
- Bendas** G, Krause A, Schmidt R, Vogel J, Rothe U: Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery – A potential way of antiinflammatory therapy. *Pharm Acta Helv* 73 (1998) 19-26
- Biancone** L, Araki M, Araki K, Vasalli P, Stamenovic I: Redirection of tumor metastasis by expression of E-Selectin in vivo. *J Exp Med* 183 (1996) 581-587
- Carmeliet** P, Ferreira V, Breier G: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380 (1996) 435-439
- Chen** Z, Milner TE, Wang X, Srinivas S, Nelson JS: Optical doppler tomography: Imaging in vivo blood flow dynamics following pharmacological intervention and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 67 (1998) 1-7
- Choi** K, Kennedy M, Kazarov A: A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125 (1998) 725-732
- Corkill** MM, Kirkham BW, Haskard DO, Barbatis C, Gibson T, Panayi GS: Gold treatment of rheumatoid arthritis decreases synovial expression of the endothelial leukocyte adhesion receptor ELAM-1. *J Rheumatol* 18 (1991) 1453-1460
- Cullen** EK: *Bull. Johns Hopkins Hosp* 15 (1903) 352-356
- Dantschakow** W: *Folia Haematol* 4 (1907) 159-166
- Dantschakow** W: *Arch mikroskop Anat* 73 (1909) 117-181
- Dawes** GS, Mott JC, Widdicombe JG: The foetal circulation in the lamb. *J Physiol* 126 (1954) 563-587

## 7. Literaturverzeichnis

- Dawson AB:** Z Zellforsch und mikroskop Anat 24 (1936) 256-268
- DeFouw DO:** Structural heterogeneity within the pulmonary microcirculation of the normal rat. Anat Rec 221 (1988) 645-654
- DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, Feinberg RN:** Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. Microvasc Res 38 (1989) 136-147
- Dunn BE, Fitzharris TP:** Differentiation of the chorionic epithelium of chick embryos maintained in shell-less culture. Dev Biol 71 (1979) 216-227
- Duval M:** Atlas d'Embryologie. G Masson, Paris, 1889, S. 116
- Djonov VG, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH:** Intussusceptive angiogenesis. Its role in embryonic vascular network formation. Circ Res 86 (2000) 286-292
- Dusseau JW, Hutchins PM, Malbasa DS:** Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. Circ Res 59/2 (1986) 163-170
- Ellis CG, Tysl K, Burgess W:** Quantification of red cell movement in microvessels: A new application of interactive computer graphics. Microvasc Res 33 (1987) 428-432
- Engel CS:** Arch mikroskop Anat 44 (1895) 237-248
- Etzioni A, Tonetti M:** Leukocyte adhesion deficiency II – from A to almost Z. Immunol Rev 178 (2000) 138-147
- Fenton B, Zweifach BW:** Microcirculatory model relating geometrical variation to changes in pressure and flow rate. Ann Biomed Eng 9 (1981) 303-321
- Féré C:** Compt rend soc biol 46 (1894) 688-689
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H:** Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380 (1996) 439-442
- Fitze-Gschwind VD:** Zur Entwicklung der Chorioallantoismembran des Hühnchens. Inaugural-Dissertation, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich, 1973
- Folkman J:** Tumor angiogenesis factors. Cancer Res 34 (1984) 2109-2113
- Folkman J:** Tumor angiogenesis. Adv Cancer Res 43 (1985) 173-203
- Fuchs A, Lindenbaum ES:** The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. Acta anat 131 (1988) 271-275
- Garrison JC, Terepka RA:** Calcium stimulated respiration and active calcium transport in the isolation CAM. J Membr Biol 7 (1972) 128-145
- Gawlowski DM, Ritter AB, Duran WN:** Reproducibility of microvascular permeability responses to successive application of bradykinin to hamster cheek pouch. Microvasc Res 24 (1982) 354-363
- Gilbert SF:** Developmental biology. 4<sup>th</sup> edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc, 1997, S. 342-350
- Hamburger V, Hamilton HL:** A series of normal stages in the development of the chick embryo. Journal of Morphology 88/1 (1951) 49-81
- Hatzopoulos A, Folkman J, Vasile E:** Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. Development 125 (1998) 1457-1468
- Hirota S:** J Coll Sci Tokyo Imp Univ 6 (1894) 337-369
- Hu N, Clark EB:** Hemodynamics of the stage 12 to stage 29 chick embryo. Circ Res 65 (1989) 1665-1670

## 7. Literaturverzeichnis

- Huang** KS, Graves BJ, Wolitzky BA: Functional analysis of selectin structure. In: Vestweber D (Ed): The selectins. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997, S. 1-31
- Huxley** JS, Murray PDF: A note on the reaction of the chick chorio-allantois to grafting. Anat Rec 28 (1924) 385-390
- Jordan** HE: Proc Natl Acad Sci US 3 (1917) 149-156
- Kalka** C, Takayuki A, Krone W, Isner JM: Angiogenese und Vaskulogenese. Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation. Herz 25/6 (2000) 611-622
- Klieneberger** K, Carl W: Die Blutmorphologie der Laboratoriumsthiere. J.A.Barth, Leipzig, 1912, S. 1-109
- Knighton** D, Ausprank D, Tapper D, Falkman J: Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. Br J Cancer 35 (1977) 347-356
- Kogut** MH, McGruder ED, Hargis DE, Corrier DE, DeLoach JR: Dynamics of avian inflammatory response to salmonella-immune lymphokines. Inflammation 18 (1994) 373-388
- Kugel** B, Eickholz P, Klein F: Parodontitis als Symptom von Syndromerkrankungen. zm 93/3 (2003) 46-47
- Kunzi-Rapp** K, Rück A, Kaufmann R: Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. Arch Dermatol Res 291 (1999) 290-295
- Leighton** J: The spread of cancer. Academic Press, New York, 1967, S. 115-193
- Lille** FR: Development of the chick. An introduction to embryologie. New York, 1952
- Manning** WJ, Li W, Edelman RR: A preliminary report comparing magnetic resonance coronary angiography with conventional angiography. N Engl J Med 328 (1993) 828-832
- Masteller** EL, Lee KP, Carlson LM, Thompson CB: Expression of sialyl Lewis<sup>x</sup> and Lewis<sup>x</sup> defines distinct stages of chicken B cell maturation. J Immunol 155 (1995) 5550-5556
- McCormik** JE, Nassauer J, Bielunas J, Leighton J: Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay system. Scan Electron Microsc 4 (1984) 2023-2030
- Metcalfe** J, Stock MK: Current topic: oxygen exchange in the chorioallantoic membrane, avian homologue of the mammalian placenta. Placenta 14 (1993) 605-613
- Meuer** HJ: Erythrocyte velocity and total blood flow in the extraembryonic circulation of early chick embryos determined by digital video technique. Microvasc Res 44 (1992) 286-294
- Meyle** J, Axmann-Krcmar D: Regression coefficient analysis of neutrophil chemotaxis in periodontitis. Oral microbiology and immunology 14/2 (1999) 127-135
- Morroll** S, Goodchild M, Salmon N, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins N, Bumstead N, Boyd Y: The genes encoding E-selectin (SELE) and lymphotactin (SCYC1) lie on separate chicken chromosomes although they are closely linked in human and mouse. Immunogenetics 53 (2001) 477-482
- Nakazawa** M, Miyagawa S, Ohno T, Miura S, Takao A: Developmental hemodynamic changes in rat embryos at 11 to 15 days of gestation: normal data of blood pressure and the effect of caffeine compared to data from the chick embryo. Pediatr Res 23 (1988) 200-205
- Narbaitz** R, Jande SS: Ultrastructural observation on the chorionic epithelium, parathyroid glands and bones from chick embryos developed in shell-less culture. J Embryol Exp Morphol 45 (1978) 1-12

## 7. Literaturverzeichnis

- Nicholas** TS, Rudnick D: The development of embryonic rat tissue upon the chick chorioallantois. *J Exp Zool* 66 (1933) 193-261
- Nonidez** JF: *Am J Anat* 28 (1920) 81-107
- Oh** SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, Mc Carthy JEG, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J: VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 188 (1997) 96-109
- Olivio** M, Bhardway R, Schulze-Osthoff K, Sorg C, Jürgen Jacob H, Flamme I: A comparative study on the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), human angiogenic factor (h- $\text{AF}$ ) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Anat Rec* 234 (1992) 105-115
- Olszowka** AJ, Tazawa H, Rahn H: A blood-gas nomogram of the chick fetus: blood flow distribution between the chorioallantois and the fetus. *Respir Physiol* 71 (1988) 315-330
- Patan** S, Haenni B, Burri H: Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. Pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res* 51 (1996) 80-98
- Patten** BM: Embryological stages in the establishing of myeloschisis with spina bifida. *Am J Anat* 93/3 (1953) 365-395
- Phillips** KM: Psittacine blood collection and Hematology: Basics for the veterinary practitioner. Department of medical microbiology, College of veterinary medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602 USA, 2004
- Plugge** EM: Charakterisierung der spacio-temporären Expression des E- und P-Selektin-Gens im Hühnerembryo. Diplomarbeit, Medizinische Fakultät, Universität Halle-Wittenberg, 2004
- Rahn** H, Matalon S, Sotherland PR: Circulatory changes and oxygen delivery in the chick embryo prior to hatching. In: Johansen K, Burggren W (Eds): Cardiovascular Shunts: Phylogenetic, Ontogenetic and Clinical Aspects. Munksgaard, Copenhagen, 1985, S. 119-221
- Ribatti** D, Nico B, Vacca A, Roncali L: Localization of factor VIII-related antigen in the endothelium of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Histochem Cell Biol* 112 (1999) 447-450
- Rizzo** V, DeFouw DO: Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation. *Tissue&Cell* 25/6 (1993) 847-856
- Rizzo** V, Steinfeld R, Kyriakides C, DeFouw DO: The microvascular unit of the 6-day chick chorioallantoic membrane: a fluorescent confocal microscopic and ultrastructural morphometric analysis of endothelial permselectivity. *Microvasc Res* 46 (1993) 320-332
- Rizzo** V, Kim D, Duran WN, DeFouw DO: Differentiation of the microvascular endothelium during early angiogenesis and respiratory onset in the chick chorioallantoic membrane. *Tissue&Cell* 27/2 (1995) 159-166
- Risau** W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386 (1997) 671-674
- Romanoff** AL: The avian embryo. Structural and functional development. New York, Macmillan, 1960
- Rous** P, Murphy JB: Tumor implantations in the developing embryo. *JAMA* 56 (1911) 741-762
- Sabin** FR: Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib Embryol* 9 (1920) 213-262
- Sato** M, Narita T, Kimura N, Zenita K, Hashimoto T, Manabe T, Kannagi R: The association of Sialyl Lewis A antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. *Anticancer Res* 17 (1997) 3505-3512

## 7. Literaturverzeichnis

**Schauinsland** H: *Zoologica* 16/39 (1903) 147-168

**Schlatter** P, König MF, Karlsson LM, Burri PH: Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvasc Res* 54 (1997) 63-73

**Schweitzer** KM, Drager AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenberg A, Theijssmeijer AP, van der Schoot CE, Langenhuijsen MM: Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells in hematopoietic tissues. *Am J Pathol* 148/1 (1996) 165-175

**Shalaby** F, Ho J, Stanford WL: A requirement for flk<sub>1</sub> in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89 (1997) 981-990

**Shi** Q, Rafii S, Wu MD: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92 (1998) 362-367

**Springer** TA: Traffic signals on endothelium for the lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57 (1995) 827-872

**Sugiyama** S: *Carnegie Inst Wash Publ, Contribs Embryol* 18 (1926) 121-147

**Takahashi** T, Kalka C, Masuda H: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularisation. *Nat Med* 5 (1999) 434-438

**Tazawa** H: Gas transfer in the chorioallantois. In: Piiper J (Ed): *Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, S. 274-291

**Terni** T: *Arch ital anat e embriol* 21 (1924) 533-561

**Tibboel** D, Molenaar JC, Van Nie CJ: New perspectives in fetal surgery: the chicken embryo. *J Pediatr Surg* 14 (1979) 438-440

**Tuan** RS, Nguyen HQ: Cardiovascular changes in calcium-deficient chick embryos. *J Exp Med* 165 (1987) 1418-1423

**Varki** A: Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 7390

**Vu** MT, Smith CF, Burger pc, Klintworth GK: An evaluation of methods to quantitate the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis. *Lab Invest* 53 (1974) 499-508

**Van Golde** J, Mulder T, van Straaten H, Blanco CE: The chorioallantoic artery blood flow of the chick embryo from stage 34 to 43. *Pediatric Res* 40/6 (1996) 867-871

**Wagman** AJ, Hu N, Clark EB: Effect of changes in circulating blood volume on cardiac output and arterial and ventricular blood pressure in the stage 18, 24 and 29 chick embryo. *Circ Res* 67 (1990) 187-192

**White** PT: Experimental studies on the circulatory system of the late chick embryo. *J Exp Biol* 61 (1974) 571-592

**Woodruff** AM, Goodpasture EW: The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus. *Am J Pathol* 7 (1931) 209-222

**Yang** EY, Moses HL: Transforming growth factor induces changes in cell migration, proliferation and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 111 (1990) 731-741

**Zimmerman** GA, McIntyre TM, Prescott SM: Adhesion and signalling in vascular cell-cell-interactions. *J Clin Invest* 15 (1997) 1699-1701

**Zuckerman** AJ: Tissue and organ culture studies of hepatitis B virus. *Am J Med Sci* 270 (1975) 197-104

**8 Anhang (Tabellen, Diagramme und Fotoatlas)**P-Selektin 0. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	0,22	0,11	0,005	<0,0001
10	0,38	0,46	X	0,478
17	0,42	0,19	X	X

BSA 0. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	0,27	0,15	0,014	<0,0001
10	0,40	0,39	X	0,058
17	0,50	0,29	X	X

P-Selektin 1. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	0,48	0,21	<0,0001	0,006
10	0,77	0,29	X	0,267
17	0,69	0,51	X	X

BSA 1. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	0,46	0,22	<0,0001	<0,0001
10	0,83	0,36	X	0,313
17	0,89	0,30	X	X

P-Selektin 2. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	0,71	0,32	<0,0001	0,002
10	0,96	0,31	X	0,395
17	0,91	0,38	X	X

BSA 2. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	0,74	0,37	<0,0001	<0,0001
10	1,08	0,32	X	0,101
17	1,18	0,38	X	X

P-Selektin 3. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	1,01	0,40	0,012	0,180
10	1,27	0,59	X	0,243
17	1,14	0,52	X	X

BSA 3. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	1,09	0,40	0,005	<0,0001
10	1,35	0,57	X	0,596
17	1,40	0,48	X	X

P-Selektin 4. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	1,38	0,51	0,521	0,396
10	1,46	0,54	X	0,199
17	1,28	0,55	X	X

BSA 4. Ordnung

v (mm/s)			p-Wert im Vergleich zu Tag	
Tag	MW	Stab	10	17
7	1,41	0,51	0,508	0,016
10	1,49	0,69	X	0,290
17	1,68	0,69	X	X

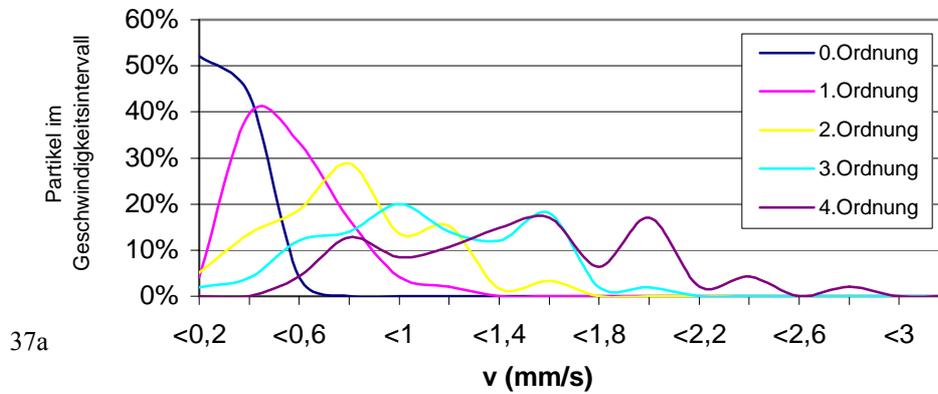
Tabelle 4:

Darstellung der Mittelwerte (MW), der Standardabweichungen (Stab) und p-Werte (Kreuzvergleich) der beschichteten Partikel. Die p-Werte vergleichen den 7., 10. und 17. Entwicklungstag in jeder Gefäßordnung.

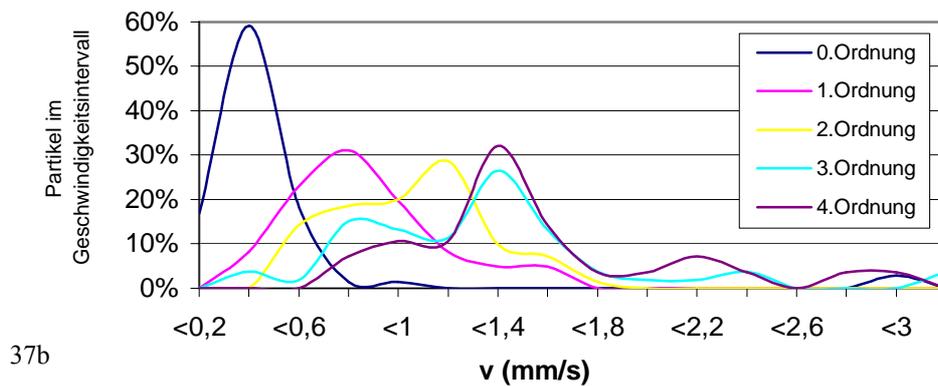
## Geschwindigkeitsvergleich in allen Ordnungen

- im gleichaltrigen Embryo (7d, 10d, 17d) -

### P-Selektin im 7d Embryo



### P-Selektin im 10d Embryo



### P-Selektin im 17d Embryo

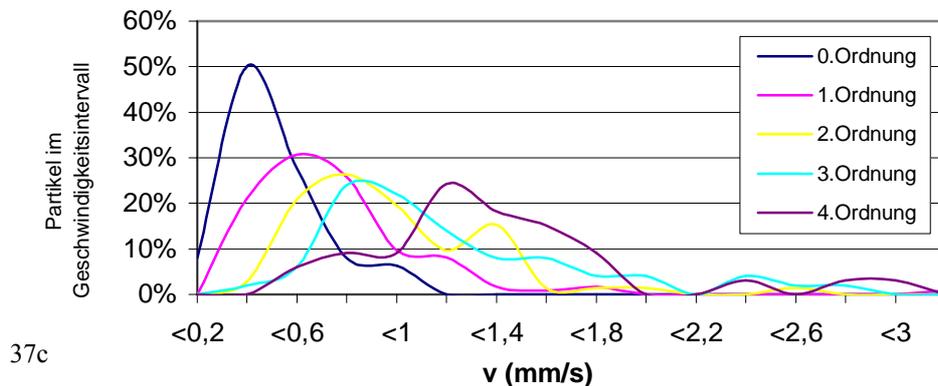
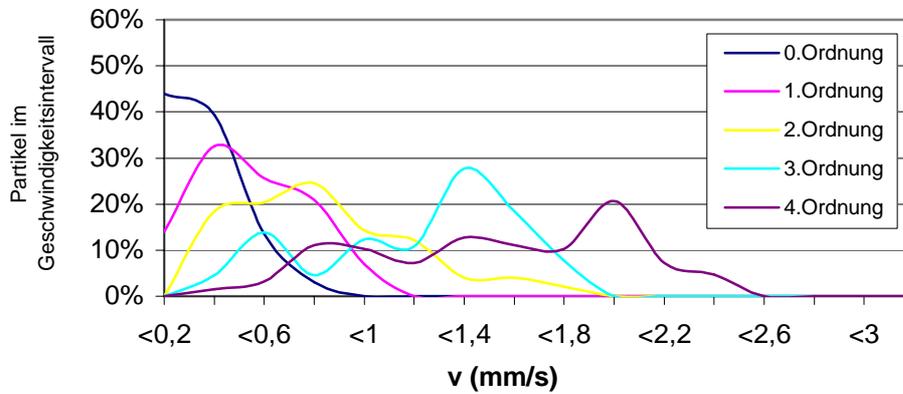


Abb. 37a-c: Darstellung der Geschwindigkeiten (P-Selektin beschichtete Partikel) aller Ordnungen im 7, 10 und 17-tägigen Embryo. Die Höhe der Kurve gibt den Prozentsatz aller Partikel an, welche sich mit der jeweiligen Geschwindigkeit bewegten. Je weiter rechts der Peak der jeweiligen Kurve, um so schneller bewegten sich die meisten Partikel intravasal.

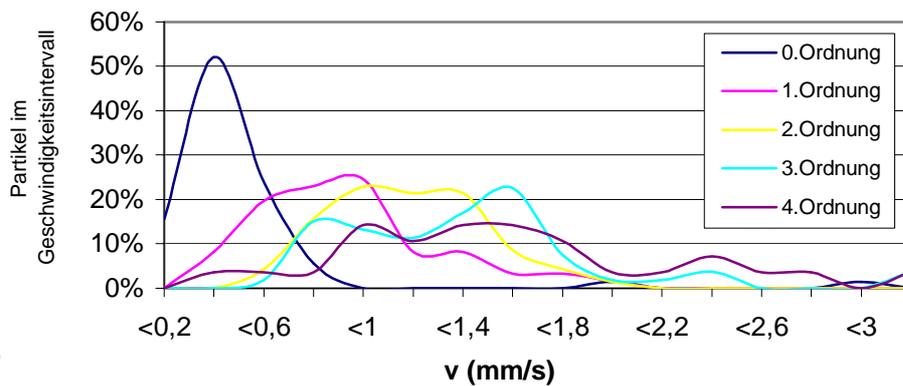
## Geschwindigkeitsvergleich in allen Ordnungen

- im gleichaltrigen Embryo (7d, 10d, 17d) -

### BSA im 7d Embryo



### BSA im 10d Embryo



### BSA im 17d Embryo

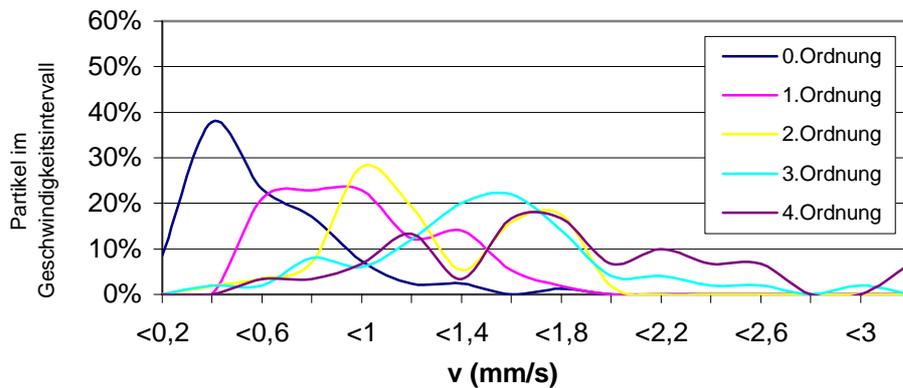


Abb. 38a-c: Darstellung der Geschwindigkeiten (BSA beschichtete Partikel) aller Ordnungen im 7, 10 und 17-tägigen Embryo. Die Höhe der Kurve gibt den Prozentsatz aller Partikel an, welche sich mit der jeweiligen Geschwindigkeit bewegten. Je weiter rechts der Peak der jeweiligen Kurve, um so schneller bewegten sich die meisten Partikel intravasal.

Vergleich der einzelnen Ordnungen  
- an verschiedenen Entwicklungstagen -

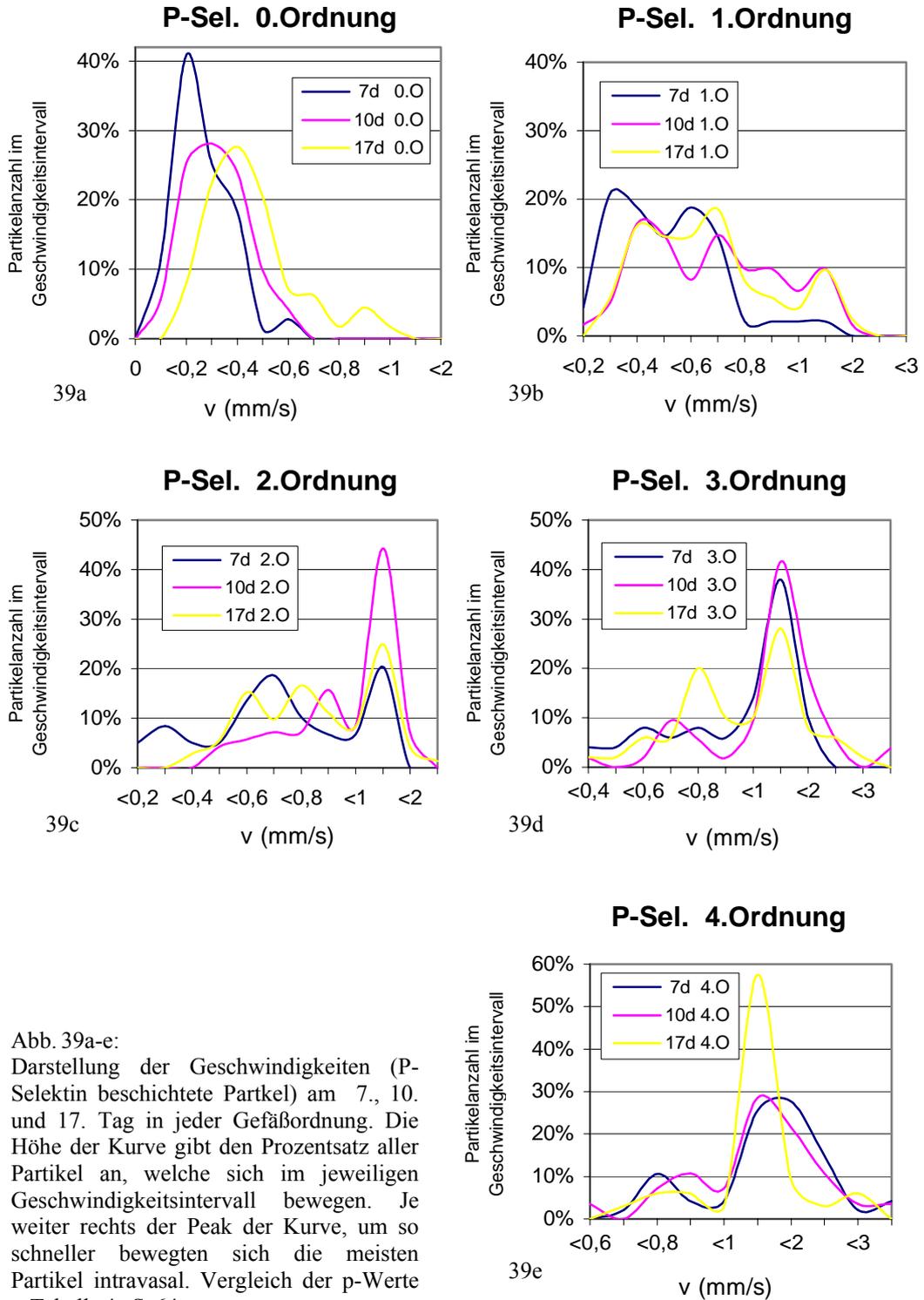


Abb. 39a-e:  
Darstellung der Geschwindigkeiten (P-Selektin beschichtete Partikel) am 7., 10. und 17. Tag in jeder Gefäßordnung. Die Höhe der Kurve gibt den Prozentsatz aller Partikel an, welche sich im jeweiligen Geschwindigkeitsintervall bewegen. Je weiter rechts der Peak der Kurve, um so schneller bewegten sich die meisten Partikel intravasal. Vergleich der p-Werte s. Tabelle 4, S. 64

Vergleich der einzelnen Ordnungen  
- an verschiedenen Entwicklungstagen -

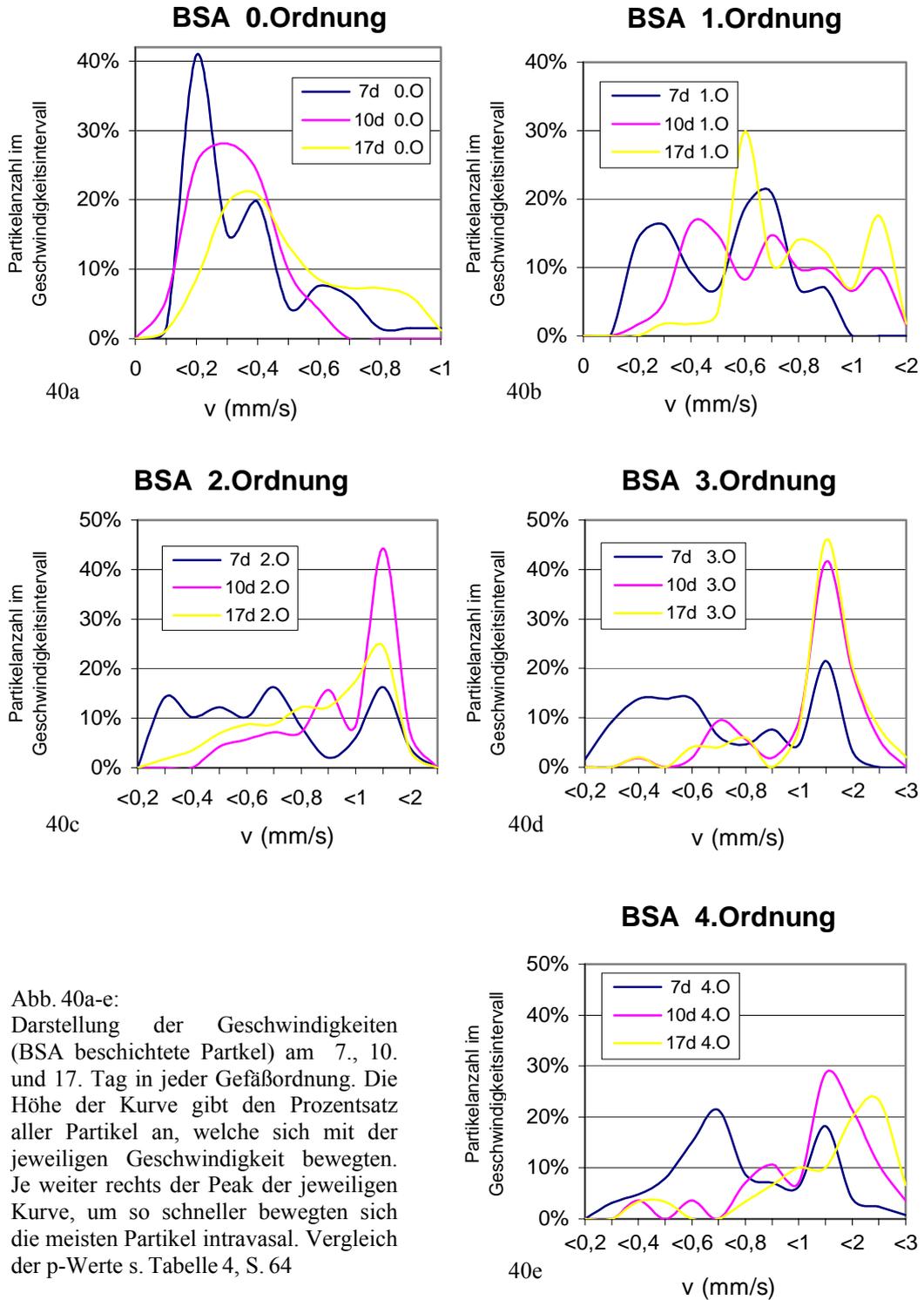


Abb. 40a-e:  
Darstellung der Geschwindigkeiten (BSA beschichtete Partikel) am 7., 10. und 17. Tag in jeder Gefäßordnung. Die Höhe der Kurve gibt den Prozentsatz aller Partikel an, welche sich mit der jeweiligen Geschwindigkeit bewegten. Je weiter rechts der Peak der jeweiligen Kurve, um so schneller bewegten sich die meisten Partikel intravasal. Vergleich der p-Werte s. Tabelle 4, S. 64

## 1d Embryo

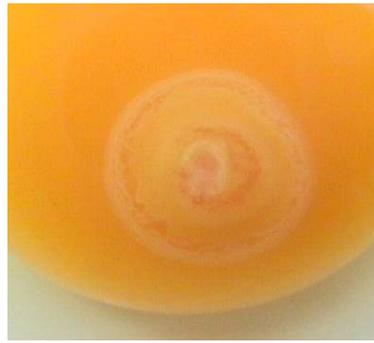


Abb. 41  
Embryo 1 Tag alt

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	1-6
Größe der CAM (Ø):	/
Größe des Embryos:	2,2 mm

## 2d Embryo

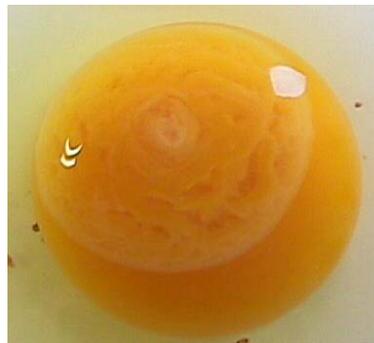


Abb. 42  
Embryo 2 Tage alt

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	7-12
Größe der CAM (Ø):	/
Größe des Embryos:	4,5 mm

## 2,5d Embryo



Abb. 43  
Embryo 2,5 Tage alt

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	13-17
Größe der CAM (Ø):	/
Größe des Embryos:	6

## 3d Embryo



Abb. 44a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	17-20
Größe der CAM (Ø):	/
Größe des Embryos:	6,2

## 4d Embryo

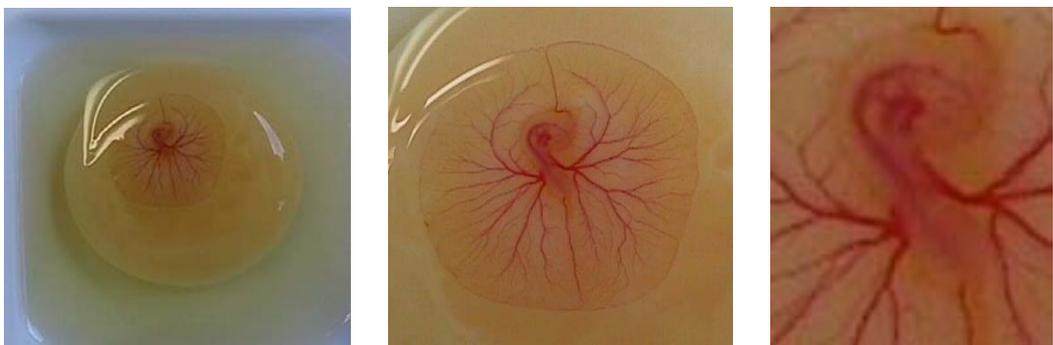


Abb. 45a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	21-24
Größe der CAM (Ø):	/
Größe des Embryos:	7 mm

## 5 d Embryo

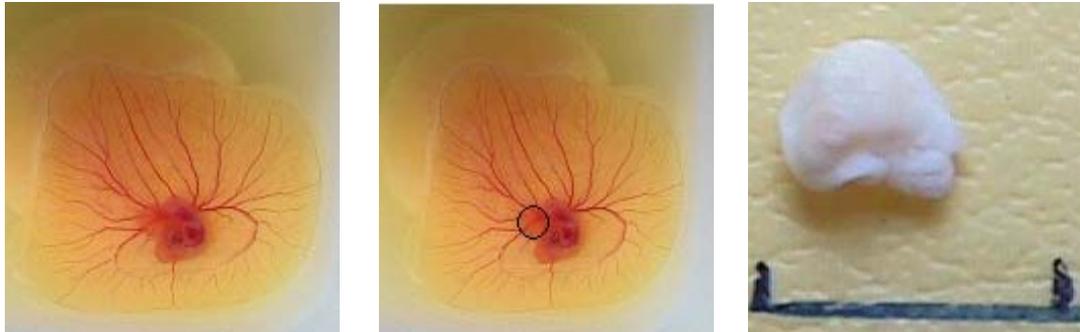


Abb. 46a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	25-26
Größe der CAM (Ø):	5,1 mm
Größe des Embryos:	6,5 mm

## 6 d Embryo

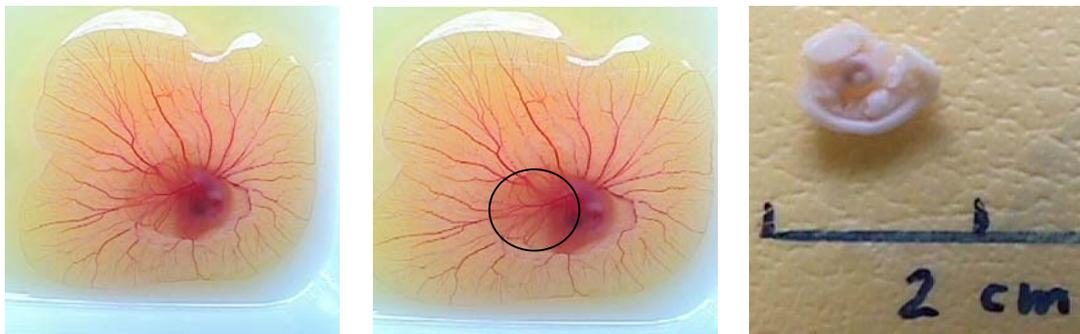


Abb. 47a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	27-28
Größe der CAM (Ø):	15,2 mm
Größe des Embryos:	9,5 mm

## 7d Embryo

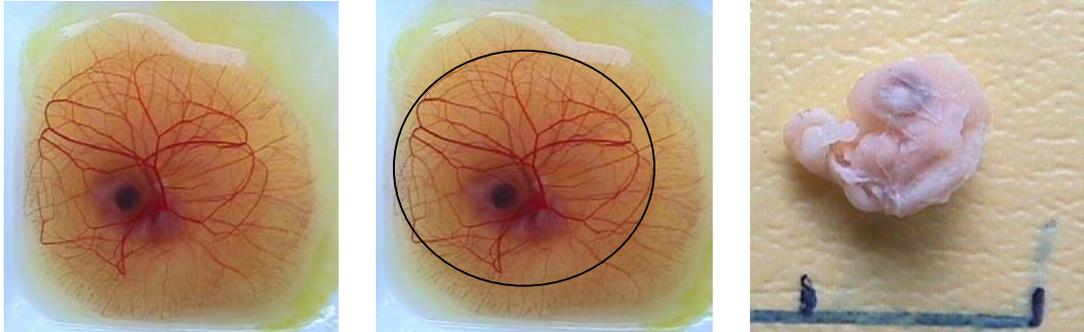


Abb. 48a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	29-30
Größe der CAM (Ø):	44,3 mm
Größe des Embryos:	13 mm

## 8d Embryo

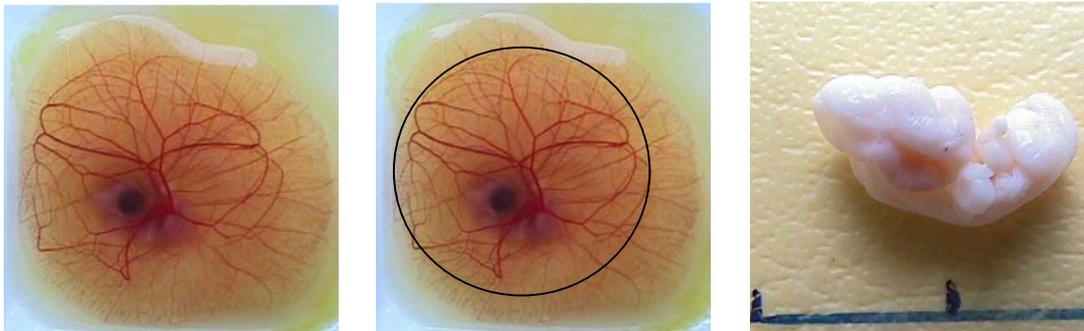


Abb. 49a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	31-34
Größe der CAM (Ø):	49,8 mm
Größe des Embryos:	18 mm

## 9d Embryo

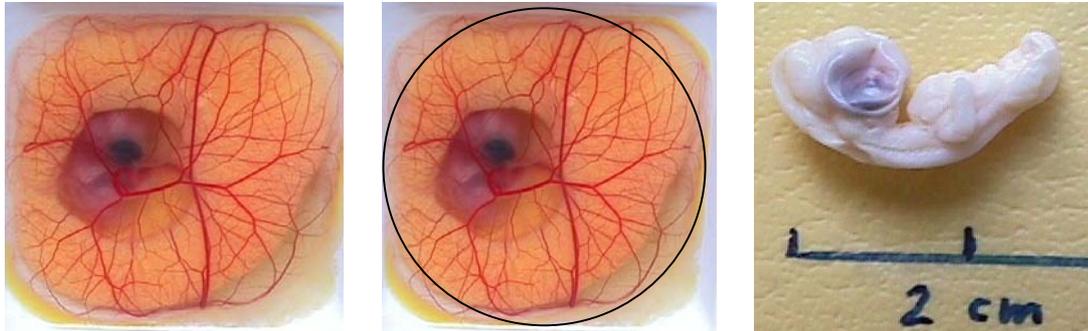


Abb. 50a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	35
Größe der CAM (Ø):	64 mm
Größe des Embryos:	21 mm

## 10d Embryo

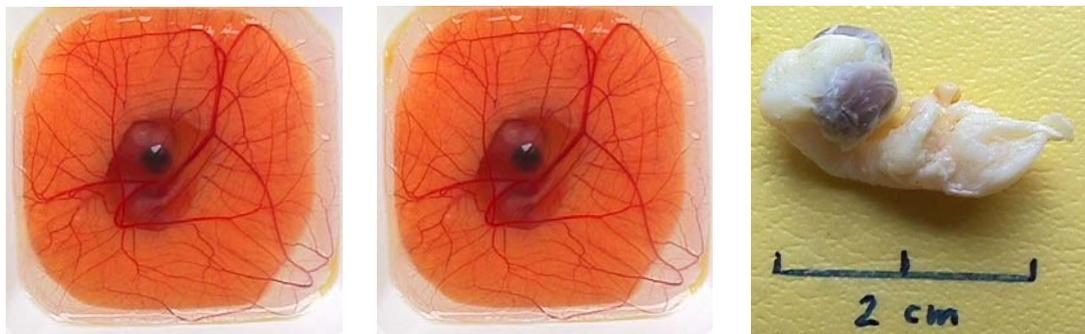


Abb. 51a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	36
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	25 mm

## 11 d Embryo

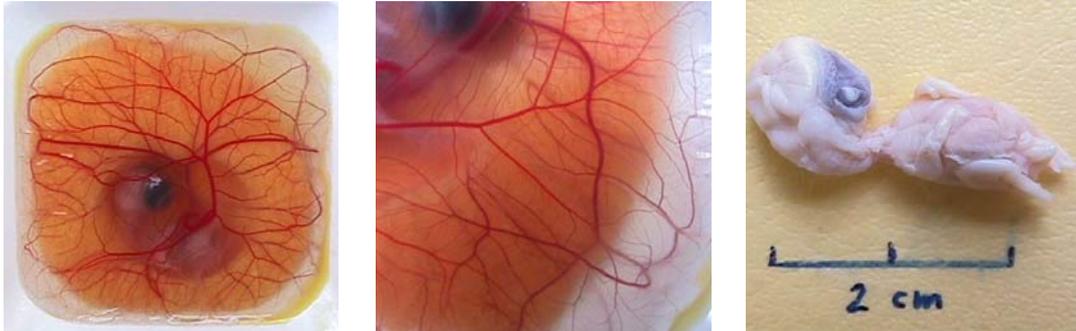


Abb. 52a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	37
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	30 mm

## 12 d Embryo

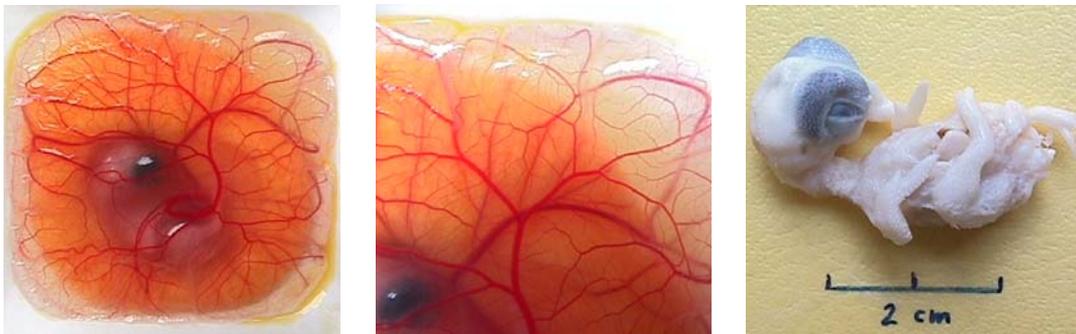


Abb. 53a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	38
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	40 mm

## 13 d Embryo

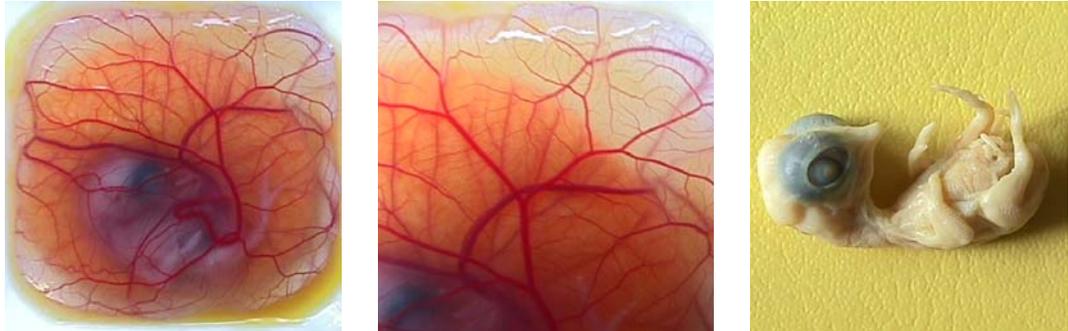


Abb. 54a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	39
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	47 mm

## 14 d Embryo

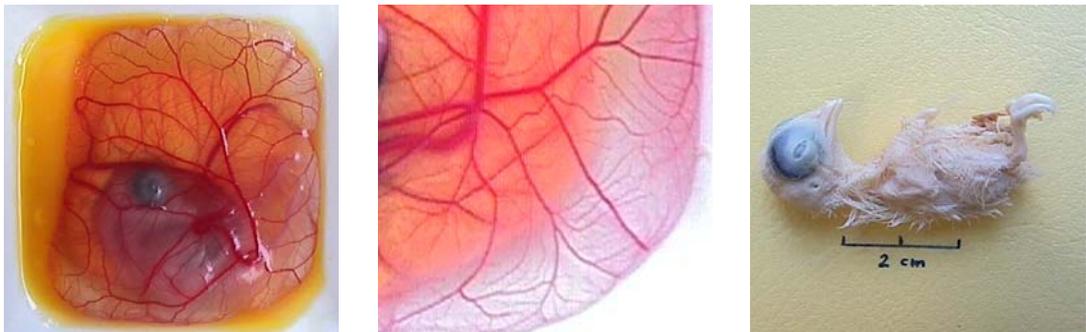


Abb. 55a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	40
Größe der CAM (Ø):	> 70 mm
Größe des Embryos:	55 mm

## 15 d Embryo

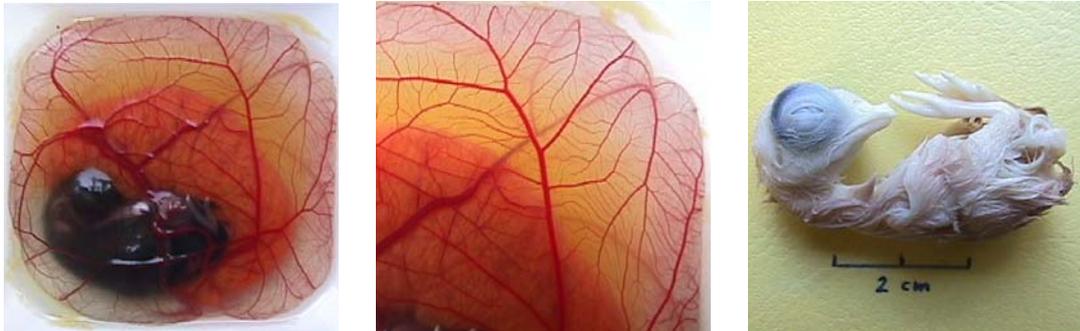


Abb. 56a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	41
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	59 mm

## 16 d Embryo



Abb. 57a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	42
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	61 mm

## 17d Embryo

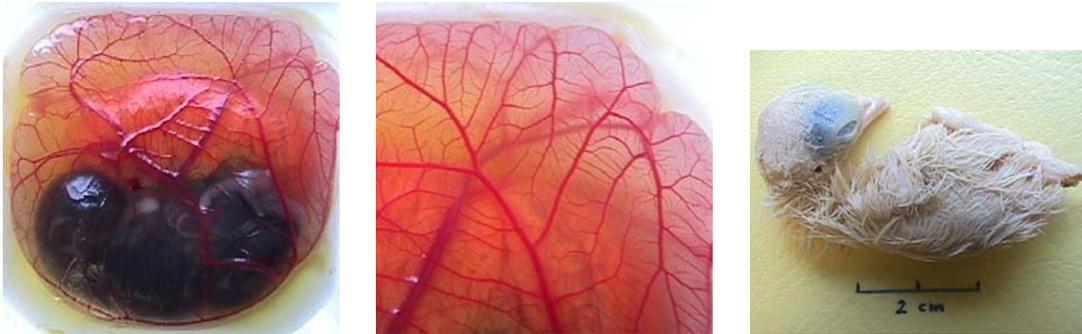


Abb. 58a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	43
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	63 mm

## 18d Embryo

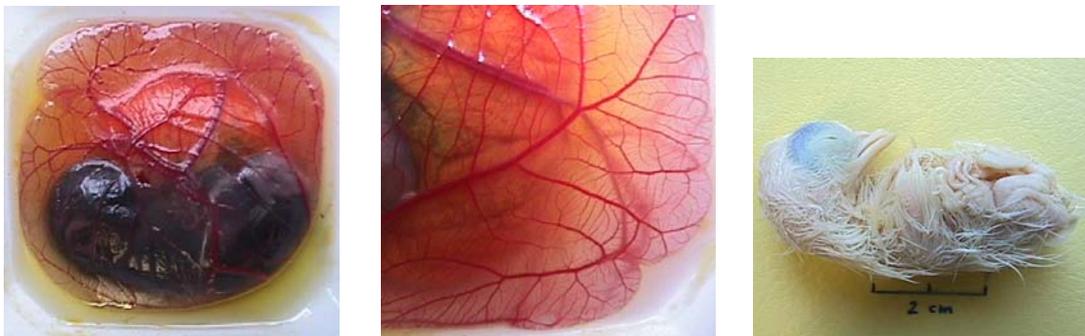


Abb. 59a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	44
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	64 mm

## 19 d Embryo

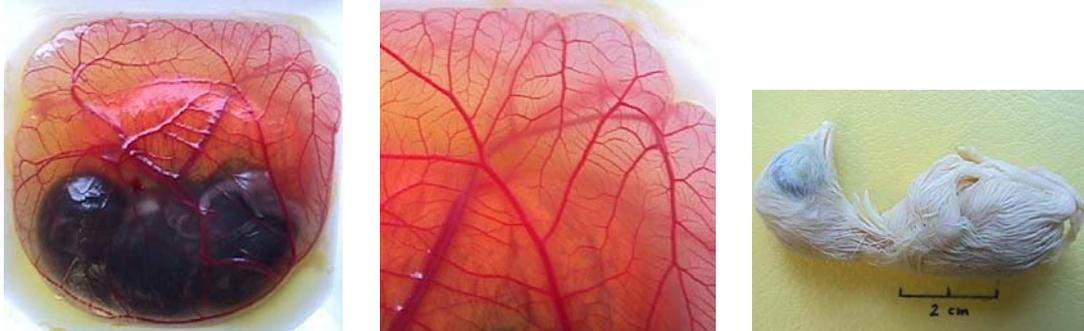


Abb. 60a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	45
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	66 mm

## 20 d Embryo

## 21 d Embryo



Abb. 61a-c

Hamburger-Hamilton-Stadium (stage):	45
Größe der CAM (Ø):	>70 mm
Größe des Embryos:	67 mm

## 9 Thesen

1. Entzündungsprozesse spielen im Säuger- als auch im Vogelorganismus eine wichtige Rolle.
2. Die Selektine leiten das Leukozytenrollen am Beginn der Adhäsionskaskade ein. Bei einem Defekt der Selektinexpression kommt es trotz erhöhter Leukozytenzahl zu keiner ausreichenden Extravasation von Leukozyten in das entzündete Gewebe.
3. Bisher sind nur wenige, schwach affine Liganden zu den Selektinen bekannt.
4. Das CAM-Modell des Hühnerembryos erwies sich sowohl in der Handhabung als auch von der Gesetzgebung als gut geeignet, zu untersuchende, selektinhaltige Objekte intravasal zu injizieren und deren Blutflußgeschwindigkeit in vivo zu bestimmen.
5. Die Blutzirkulation im Hühnerembryo ist vergleichbar mit der des menschlichen Fetus. Es kann daher angenommen werden, daß unsere Beobachtungen und Meßergebnisse auch auf den Säugerfetus zutreffen.
6. Bei der Embryokultivierung wurden die besten Überlebensraten mit der „Spiegeleimethode“ in Waageschälchen mit 78 % rel. Luftfeuchte und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5 % erzielt.
7. Zur Entwicklung des Versuchsaufbaus und Erlernens der optimalen Injektionstechnik wurden fluoreszierende FITC-Partikel verwendet.
8. Bis zum 10. Entwicklungstag erwies sich die Mikroinjektion, danach die Technik der Makroinjektion als am geeignetsten, um möglichst atraumatisch eine ausreichende Menge an Objekten intravasal zu injizieren.
9. Durch Transfektion (CHO-Zellen) oder Behandlung mit Calcein-AM-Ester™ (CHO-, U937-Zellen, hühnereigene Leukozyten) fluoreszierten die Zellen unter UV-Licht im Stereomikroskop grün und konnten somit isoliert betrachtet werden.

## 9. Thesen

10. Die Injektion der CHO- und der U937-Zellen erwies sich als schwierig, gelang jedoch. Aufgrund ihres physikalischen Verhaltens (starke Adhäsion am Gefäßendothel) waren differenzierte Geschwindigkeitsbestimmungen aber unmöglich.
11. Die Hauptversuche wurden mit beschichteten FITC-Partikeln (P-Selektin/BSA) durchgeführt. Es wurden die Geschwindigkeiten von der 0. bis zur 4. Gefäßordnung am 7., 10. und 17. Entwicklungstag gemessen. Signifikant niedrigere Geschwindigkeiten der selektinbeschichteten Partikel gegenüber den BSA-Kontrollpartikeln wurden am 7. Tag in der 0. Ordnung (Kapillargefäße), am 10. Tag in der 2. Ordnung sowie am 17. Tag in allen Gefäßordnungen gemessen. Der größte, hochsignifikanteste Unterschied wurde am 17. Tag in der 2. Ordnung festgestellt.
12. Die Injektion von fluoreszierenden hühnereigenen Leukozyten zeigte, daß sich diese ebenfalls für intravasale lichtmikroskopische Beobachtungen sowie Geschwindigkeitsbestimmungen eignen. Auf dieser Grundlage können viele weiterführende Experimente aufbauen und unter möglichst realen physiologischen Bedingungen Selektin-Liganden-Wechselwirkungen untersucht werden.
13. Die Darstellung der Entwicklungsstadien, die Größe der Embryos und deren CAM und die Zuordnung nach der Einteilung von Hamburger-Hamilton zeigt der angefertigte Fotoatlas.
14. Die CAM ist zwischen dem 4. und 5. Tag zu erkennen und breitet sich bis zum 9. Tag über die gesamte Oberfläche des Inkubationsbehälters aus. Danach ist nur noch ein Anstieg an Komplexizität zu erkennen.

## Lebenslauf

Name:	Schüller
Vorname:	Matthias
Geburtsdatum:	06.01.1976
Geburtsort:	Oelsnitz/Vogtland
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Anschrift:	Klingenthaler Str.13 08265 Erlbach/Vogtland
1982-1990	POS in Erlbach/Vogtland und Bernburg/Saale
1990-1994	Gymnasium Klingenthal
Juni 1994	Abitur
1994-1995	1.Studienjahr Zahnmedizin an der MLU Halle-Wittenberg
1995-1996	Ableistung Grundwehrdienst als Sanitätssoldat in Halle und Bad Salzungen
1996-2000	Fortsetzung des Studiums der Zahnmedizin an der MLU Halle-Wittenberg
Juli-Oktober 2000	Staatsexamen
13.11.2000	Erhalt der Approbation als Zahnarzt
01.01.2001-31.12.2002	Assistenz Zahnarzt
seit 01.01.2003	selbständiger Zahnarzt

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit „Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung des selektinvermittelten Zellrollens – Das Chorioallantoismembran (CAM) -Modell“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Matthias Schüller

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich weder zum vorliegenden Thema, noch zu einem anderen Thema einen Promotionsversuch unternommen habe.

Matthias Schüller

## **Danksagung**

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Dr. Ulrich Rothe für die gute Zusammenarbeit, vor allem Herrn Mario Bandulik für die Hilfe bei den Computerproblemen und Frau Uschi Goder für die Bereitstellung der U937- und CHO/CHOE-Zellen.

Mein aufrichtiger Dank richtet sich an meine Familie, ohne deren Unterstützung und Geduld die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Auch möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich immer wieder motiviert haben und mir eine große Hilfe waren.

Danke Sandra auch für Deine Unterstützung und Geduld.

Am meisten möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Rothe für die langjährige und gute Betreuung der Arbeit bedanken. Danke, daß Sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und stets für mich erreichbar waren. Ohne Ihre gute Betreuung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.