

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie - Plastische Operationen der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Etablierung einer RT-qPCR Methode zur Quantifizierung von ausgewählten Angiogenese-assoziierten Faktoren und Immunmodulatoren im Chorion-Allantois-Membran Assay (CAM-Assay)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Jonas Sax
aus Essen

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12. Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DER DISSERTATION.....	1
2 LITERATURDISKUSSION	2
2.1 Chorion-Allantois-Membran Assay	2
2.1.1 Embryogenese des Haushuhns	3
2.1.1.1 Embryonalhüllen des Gallus gallus domesticus.....	5
2.1.1.1.1 Dottersackmembran.....	6
2.1.1.1.2 Die gemeinsame Entstehung von Chorion und Amnion durch Abfaltung	6
2.1.1.1.3 Allantois	7
2.1.1.2 Entwicklung und Aufbau der CAM	7
2.1.1.3 Formation des Gefäßnetzes in der CAM.....	10
2.1.1.4 Funktionen der CAM	10
2.1.2 Immunologische Aspekte des sich entwickelnden Hühnereis.....	10
2.1.2.1 Physische und chemische Barrieren.....	11
2.1.2.2 Angeborenes Immunsystem	11
2.1.2.3 Adaptive Immunabwehr	13
2.2 Angiogenese.....	14
2.2.1 Definition	14
2.2.2 Ablauf der Angiogenese.....	14
2.2.3 Der <i>Vascular endothelial growth factor</i> als Schlüsselfaktor der Angiogenese	15
2.2.4 Hypoxie induzierter Faktor 1 (HIF-1).....	16
2.2.5 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	17
2.2.6 Angiopoetine	17
2.2.7 <i>Transforming growth factor beta</i> (TGF- β)	18
2.2.8 <i>T-Box transcription factor 1</i>	19
2.2.9 Angiogenese in der CAM	19
2.2.10 Tumorassoziierte Angiogenese.....	21
2.3 Strahlentherapie und ihre Auswirkung auf Angiogenese-assoziierte Faktoren	23

3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Material.....	27
3.1.1	Chemikalien und Kits	27
3.1.2	Geräte	27
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.4	Software	29
3.1.5	Befruchtete Hühnereier	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Durchführung des Chorion-Allantois-Membran Assays	29
3.2.1.1	Inkubation.....	30
3.2.1.2	Eröffnung der Eier	30
3.2.1.3	Pflege der Bebrüter und Entnahme der Proben	32
3.2.2	RNA-Isolation und photometrische Konzentrationsbestimmung.....	32
3.2.2.1	Homogenisierung der Proben	33
3.2.2.2	RNA-Isolation	33
3.2.2.3	Messung des RNA-Gehalts mittels Photometrie.....	34
3.2.3	cDNA-Synthetisierung.....	35
3.2.4	<i>Real-time</i> quantitative Polymerasekettenreaktion.....	37
3.2.4.1	Allgemeines.....	37
3.2.4.2	Design und Bestellung der Primer	37
3.2.4.3	Durchführung der RT-qPCR.....	38
3.2.4.4	Schmelzkurvenanalyse	40
3.2.5	Bestrahlung der nativen CAM	41
3.2.5.1	Vorbereitung.....	41
3.2.5.2	Bestrahlung der nativen CAM	42
3.2.5.3	Probenentnahme.....	42
3.2.5.4	cDNA-Synthetisierung.....	43
3.2.5.5	Durchführung der RT ² Profiler qPCR Arrays.....	44
3.2.6	Statistische Auswertung.....	46
3.2.6.1	Relative Quantifizierung	46
3.2.6.2	Auswertung der RT ² Profiler qPCR Arrays.....	48
3.2.6.2.1	Einpflegen der Daten	48
3.2.6.2.2	Einrichten der Analysevoraussetzungen.....	48
3.2.6.2.3	Analyse	49
3.2.7	Grafische Darstellung der Ergebnisse	51
3.2.7.1	Darstellung der mittleren relativen Expression (<i>Fold Change</i>) der GOI.....	51
3.2.7.2	Darstellung der Ergebnisse der RT ² Profiler qPCR Arrays	52
4	ERGEBNISSE	54

4.1	Genexpressionsanalyse der Hauptversuchsreihe.....	54
4.1.1	<i>Vascular endothelial growth factor-A</i>	55
4.1.2	Matrix-Metalloproteinase 13.....	56
4.1.3	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha	57
4.1.4	Stickstoffmonoxid-Synthase 2.....	58
4.1.5	<i>Transforming growth factor beta</i>	59
4.2	Genexpressionsanalyse mit den RT² Profiler qPCR Arrays	61
4.2.1	Genexpression der unbehandelten CAM im Zeitverlauf	62
4.2.1.1	Genexpressionsunterschiede an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10.....	62
4.2.1.2	Genexpressionsunterschiede an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10.....	64
4.2.1.3	Genexpressionsunterschiede an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12.....	66
4.2.1.4	Gemeinsamkeiten der Genexpressionsveränderungen in der unbehandelten CAM in Hinblick auf die untersuchten EDD 10, 12, 14	68
4.2.2	Bestrahlung der nativen CAM	71
4.2.2.1	Strahlenwirkung auf die Genexpression in der CAM an EDD 10.....	72
4.2.2.2	Strahlenwirkung auf die Genexpression in der CAM an EDD 12.....	74
4.2.2.3	Strahlenwirkung auf die Genexpression in der CAM an EDD 14.....	77
4.2.2.4	Gemeinsamkeiten der Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung der CAM (6 Stunden) an EDD 10, 12 und 14.....	79
5	DISKUSSION	82
5.1	Genexpression in der nativen CAM.....	82
5.1.1	Genexpression Angiogenese-assoziiierter Faktoren in der CAM	82
5.1.2	Genexpression immunmodulierender Faktoren in der CAM	86
5.2	Strahlenwirkung auf die Genexpression wichtiger Schlüsselfaktoren der Angiogenese in der CAM	87
5.3	Methodische Überlegungen und Limitationen.....	91
5.3.1	Stärken und Schwächen der verwendeten Methode	91
5.3.2	Offene Fragen und Überlegungen zur Erweiterung der Methodik	93
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
7	ANHANG.....	96
8	LITERATURVERZEICHNIS	117
9	DANKSAGUNG	124

10 TABELLARISCHER LEBENSLAUF125

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ACTB	Beta-Aktin
AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
Ang1	Angiopoetin 1
Ang2	Angiopoetin 2
ANGPTL4	<i>Angiopoetin-like protein 4</i>
Angs	Angiopoetine
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CAM-Assay	Chorion-Allantois-Membran Assay
CD51 (ITGAV)	Integrin alpha-V
CD13 (ANPEP)	Alanin-Aminopeptidase
CD31 (PECAM1)	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
CD61 (RP11-290H9.2)	Integrin beta 3
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX-1 (PTGS1)	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase / Cyclooxygenase 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDD	Embryo-Entwicklungstag
EFNA2	Ephrin A2
EFNB2	Ephrin B2
EPHB2	<i>EPH receptor B2</i>
EPO	Erythropoetin
EZM	Extrazellulärmatix
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
FGFR3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3
GDC	Kontrolle zur Überprüfung auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA
GOI	<i>Gene of interest</i>
Gy	Gray
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIF1	Hypoxie-induzierter Faktor 1

HIF-1/2/3 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1/2/3 alpha
HIF-1 β	Hypoxie-induzierter Faktor 1 beta
HKG	Haushaltsgen
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HREs	<i>Hypoxia response elements</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgY	Immunglobulin Y
IL6	Interleukin 6
IL8L1	Interleukin 8
LECT1	<i>Leukocyte cell derived chemotaxin 1</i>
LOC422654	<i>Similar to K60 protein</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP13	Matrix-Metalloproteinase 13
MMP14	Matrix-Metalloproteinase 14
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
MMP9	Matrix-Metalloproteinase 9
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOS2/iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase 2
NRP1	Neuropilin 1
NRP2	Neuropilin 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFA	<i>Platelet-derived growth factor A</i>
PDGFC	<i>Platelet-derived growth factor C</i>
PGF	Plazenta-Wachstumsfaktor
PPC	Positive PCR-Kontrolle
PROK2	Prokineticin 2
RLT	RNeasy Lysis Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Wasch-Puffer

RTC	Reverse Transkription-Kontrolle
RT-qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i>
s	Sekunde
SDF-1	CXC-Motiv-Chemokin 12
SERPINB5	<i>Serin peptidase inhibitor clade B, member 5</i>
TBX1	<i>T-box transcription factor 1</i>
TEK, TIE2	<i>Tyrosine Kinase With Ig And EGF Homology Domains-2</i>
TGF α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
THBS1	Thrombospondin 1
THBS2	Thrombospondin 2
TIE1	<i>Tyrosine Kinase With Ig And EGF Homology Domains-1</i>
TIMP2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 2</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VE-Cadherin / CDH5	Vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGF-C	<i>Vascular endothelial growth factor C</i>
VEGF-D / FIGF	<i>Vascular endothelial growth factor D / C-fos induced growth factor</i>
VEGFR1 / FLT1	<i>Vascular endothelial growth factor-receptor 1 / Fms related tyrosin kinase 1</i>
VEGFR2 / KDR	<i>Vascular endothelial growth factor-receptor 2 / Kinase insert domain receptor</i>
VEGFR3	<i>Vascular endothelial growth factor-receptor 3</i>
VEGFs	<i>Vascular endothelial growth factors</i>
x g	Relative Zentrifugalkraft
β -ME	Beta-Mercaptoethanol
μ g	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Hühnereis	4
Abbildung 2: Schematische Abbildung der Keimblattbildung des Hühnerembryos	5
Abbildung 3: Mikroskopischer Querschnitt der dreischichtigen CAM an EDD 14, HE-Färbung	8
Abbildung 4: schematische Darstellung der Embryonalhüllen des Gallus gallus domesticus .	9
Abbildung 5: Exemplarischer Versuchsaufbau.....	30
Abbildung 6: Schrittweise Eröffnung der Eier.....	31
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Schmelzkurven bei Amplifikation eines einzigen PCR-Produktes	40
Abbildung 8: Grafische Darstellung der Schmelzkurven bei Amplifikation mehrerer PCR- Produkte	41
Abbildung 9: Bestrahlung der nativen CAM	42
Abbildung 10: Layout des RT ² Profiler qPCR Arrays	45
Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung eines Vulcano Plots	53
Abbildung 12: mittlere relative Expression (Fold Change) des VEGF-A.....	55
Abbildung 13: mittlere relative Expression (Fold Change) des MMP-13.....	57
Abbildung 14: mittlere relative Expression (Fold Change) des HIF-1 α	58
Abbildung 15: mittlere relative Expression (Fold Change) des NOS2.....	59
Abbildung 16: mittlere relative Expression (Fold Change) des TGF- β	60
Abbildung 17: Genexpression in der unbehandelten CAM an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10	63
Abbildung 18: Genexpression in der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10	65
Abbildung 19: Genexpression in der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12	67
Abbildung 20: Darstellung der veränderten Genexpression der behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an EDD 10 (6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy) 73	
Abbildung 21: Darstellung der veränderten Genexpression der behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an EDD 12 (6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy) 75	
Abbildung 22: Darstellung der veränderten Genexpression der behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an EDD 14 (6 Stunden nach Bestrahlung).....	78
Abbildung 23: Plattenbelegung des RT ² Profiler qPCR Arrays, Chicken Angiogenesis, PAGG-024ZA, Abbildung von QIAGEN®.....	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht bereits per RT-qPCR detektierter Angiogenese-assoziiierter Faktoren in der CAM	20
Tabelle 2: Tabellarische Übersicht ausgewählter Untersuchungen über Strahlenwirkung auf Angiogenese-assoziierte Faktoren.....	26
Tabelle 3: Chemikalien und Kits.....	27
Tabelle 4: Geräte.....	27
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 6: Software	29
Tabelle 7: Protokoll der Reversen Transkription	36
Tabelle 8: Verwendete Primer.....	38
Tabelle 9: Mischverhältnis des Mastermix pro well.....	38
Tabelle 10: Protokoll der RT-qPCR.....	39
Tabelle 11: Komponenten zum Ansatz des reverse transcription mix zur Synthetisierung der cDNA für die RT ² Profiler qPCR Arrays.....	43
Tabelle 12: Pipettierschema der PCR-Komponenten des RT ² Profiler qPCR Arrays	46
Tabelle 13: RT- qPCR Temperatur-Protokoll des RT ² Profiler qPCR Arrays.....	46
Tabelle 14: Interpretation des GDC-Wertes für das RT ² Profiler qPCR Array	49
Tabelle 15: Bemerkungen in der Darstellung der Rohdaten im GeneGlobe Data Analysis Center (QIAGEN®) und deren Bedeutung.....	50
Tabelle 16: Signifikante Genexpressionsunterschiede der unbehandelten CAM an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10	64
Tabelle 17: Signifikante Genexpressionsunterschiede der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10	66
Tabelle 18: Signifikante Genexpressionsunterschiede der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12	68
Tabelle 19: Tabellarische Übersicht derjenigen Gene, deren Genexpression an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10, an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 und an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10 eine gleiche Tendenz in Hinblick auf eine Zu- oder Abnahme der Genexpression aufweisen konnten.	69
Tabelle 20: Übersicht über Genexpressionszu- und abnahmen der Tagesvergleiche EDD 12 mit EDD 10 und EDD 14 mit EDD 12 mit den RT ² qPCR Profiler Arrays.....	71
Tabelle 21: Signifikante Genexpressionsunterschiede in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen in der CAM an EDD 10, 6 Stunden nach Bestrahlung	74

Tabelle 22: Signifikante Genexpressionsunterschiede in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen in der CAM an EDD 12, 6 Stunden nach Bestrahlung	76
Tabelle 23: Signifikante Genexpressionsunterschiede in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen in der CAM an EDD 14, 6 Stunden nach Bestrahlung	79
Tabelle 24: Übersicht über gemeinsame signifikante Genexpressionsunterschiede der bestrahlten Proben der CAM im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen an EDD 10,12, 14.	80
Tabelle 25: Detaillierte Aufstellung der auf dem Array befindlichen Gene, passend zur Abbildung 23, exportiert von QIAGEN®.....	96
Tabelle 26: Rohdaten des VEGF-A mit deskriptiver Statistik.....	99
Tabelle 27: Rohdaten des MMP13 mit deskriptiver Statistik.....	99
Tabelle 28: Rohdaten des HIF-1 α mit deskriptiver Statistik	100
Tabelle 29: Rohdaten des NOS2 mit deskriptiver Statistik.....	101
Tabelle 30: Rohdaten des TGF- β mit deskriptiver Statistik.....	101
Tabelle 31: Rohdaten des RT ² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 12 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 10	102
Tabelle 32: Rohdaten des RT ² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 10	104
Tabelle 33: Rohdaten des RT ² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 12	107
Tabelle 34: Rohdaten des an EDD 10 durchgeführten RT ² Profiler qPCR Arrays mit den behandelten Proben, entnommen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe	109
Tabelle 35: Rohdaten des an EDD 12 durchgeführten RT ² Profiler qPCR Arrays mit den behandelten Proben, entnommen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe	111
Tabelle 36: Rohdaten des an EDD 14 durchgeführten RT ² Profiler qPCR Arrays mit den behandelten Proben, entnommen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe	114

1 Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

Die Chorion-Allantois-Membran (CAM) bietet aufgrund ihres dichten kapillären Netzwerkes mit einfacher Zugänglichkeit ideale Voraussetzungen, um pro- und antiangiogene Effekte verschiedener Substanzen, Gewebe oder Präparate kostengünstig zu untersuchen. Als alternatives Modellsystem zu *in vivo* Nagetierversuchen und *in vitro* Zellkultursystemen konnte das Chorion-Allantois-Membran Assay (CAM-Assay) sich in den vergangenen Jahrzehnten immer besser in der biomedizinischen Forschung etablieren. Dabei ist jedoch bis heute wenig über die grundlegende Genexpression wichtiger Angiogenese-assoziiierter Faktoren und Immunmodulatoren in der CAM bekannt. Primäres Ziel dieser Arbeit war es, eine Methodik zu etablieren, die es ermöglicht, zu verschiedenen Zeitpunkten der Eientwicklung Ribonukleinsäure (RNA) zu isolieren, diese in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umzuschreiben und schließlich mittels einer quantitativen *real-time* Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) Genexpressionsanalysen ausgewählter Gene durchzuführen.

Nach erfolgter Etablierung sollte zudem exemplarisch eine etablierte Therapieanwendung, welche in engem Zusammenhang mit der Angiogenese steht, und deren Einfluss auf die Genexpression in der CAM untersucht werden. Die Strahlentherapie hat sich über die letzten Jahrzehnte als eine der wichtigsten Therapieoptionen in der Onkologie bewährt. Allerdings gelten die direkten Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf das Gewebe und die tumorale Mikroumgebung als noch immer nicht vollends verstanden. Mittels speziell für die Angiogenese des Huhns gefertigten RT² Profiler qPCR Arrays der Firma QIAGEN® sollte die unmittelbare Einwirkung von hochdosierter Röntgenstrahlung auf die CAM und deren möglicher Einfluss auf die Angiogenese in Form von Genexpressionsveränderungen quantifiziert werden.

2 Literaturdiskussion

Die moderne biomedizinische Forschung sieht sich immer wieder neu mit der Suche nach geeigneten Modellsystemen konfrontiert, die zur Beantwortung von entsprechenden Fragestellungen hinreichend geeignet und gleichzeitig ethisch vertretbar sind. Klassische Experimente *in vitro* in Zellkultursystemen sind zwar ethisch unbedenklicher und vergleichsweise kostengünstig, ihre Aussagekraft über komplexe Mechanismen in Organismen ist jedoch oft sehr beschränkt. Auf der anderen Seite sind Versuche mit Nagetieren *in vivo* zwar gut etabliert, ethisch jedoch umstritten und auch hier ist die Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus nicht immer gegeben. Zwischen diesen experimentellen Systemen hat sich in den letzten Jahrzehnten das CAM-Assay etabliert, das gut dazu geeignet ist, eine Brücke zwischen *in vitro* Modellen und Tierversuchen mit Nagern zu schlagen.

2.1 Chorion-Allantois-Membran Assay

Während der Embryonalentwicklung des Eis von Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) entsteht durch die Fusion zweier extraembryonaler Membranen, der Allantois und dem Chorion, eine stark vaskularisierte Membran, die CAM. Diese ist leicht zugänglich und gut visualisierbar. Untersuchungen, die sich auf diese Membran sowohl *in ovo* als auch *ex ovo* beziehen, verstehen sich als CAM-Assay. Während bei den *ex ovo* Untersuchungen der Inhalt des Eis nach dem Aufbrechen der Schale zur Fortführung des Versuches in ein neues Behältnis, beispielsweise in eine Petrischale, überführt wird, wird bei den *in ovo* Untersuchungen lediglich eine kleine Fensterung des Eis vorgenommen. Dadurch wird ein Teil der CAM sichtbar und so für Versuche zugänglich (1-3).

Erste *in ovo* Versuche mit dem CAM-Assay Anfang des 20. Jahrhunderts beinhalteten die Transplantation verschiedener Tumore auf die CAM sowie die Kultivierung verschiedener Viren und Bakterien (4, 5). Vermehrte Aufmerksamkeit erhielt das CAM-Assay in den 1980er-Jahren als Alternative und Ersatz des Draize-Augenreizungstests zur Toxizitätsbestimmung verschiedener Substanzen (6). Heute wird die CAM für eine ganze Bandbreite verschiedenster Versuchsaufbauten genutzt. Zu gängigen *in ovo* Experimenten zählen Untersuchungen zur Angiogenese, dem Metastasierungs- und Wachstumsverhalten von Tumoren, Untersuchungen der Biokompatibilität in den Materialwissenschaften sowie im *Tissue Engineering* (7).

Dass sich das CAM-Assay als biomedizinisches Forschungsmodell etabliert hat, hat vielerlei Gründe. Gerade im Hinblick auf die ethischen Bedenken gegenüber klassischen Tierversuchen ist das CAM-Assay in der Lage, die Notwendigkeit des größtmöglichen Tierwohls bei dennoch nötiger Forschung an lebenden Organismen miteinander in Verbindung zu bringen. Als Maßstab der Forschung gilt heutzutage die 3R-Regel (*reduce, refine, replace*) (8). Diese Kriterien werden durch das CAM-Assay erfüllt (2, 7, 9). Zusätzlich dazu profitieren Forschende von der Dynamik des embryonalen Organismus, welche mit einer erheblichen Zeitersparnis einhergeht, und eine einfache Zugänglichkeit zu einem stark vaskularisiertem, nicht-innervierten System ist gegeben (7). Nebenbei besticht das Modell durch seine einfache Handhabung. Bis auf die Nutzung eines Bebrüters kommen vor allem alltägliche Laborutensilien zum Einsatz, aufwendige Modalitäten wie das Unterbringen von Nagetieren in Tierställen bleiben den Forschenden erspart.

2.1.1 Embryogenese des Haushuhns

Die eigentliche Eizelle entspricht beim *Gallus gallus domesticus*, wie bei anderen Amnioten auch, dem Eigelb. Dieses Eigelb, welches von der Vitellinmembran umschlossen wird, ist umgeben von Eiweiß, einer Pergamenthaut und einer Kalkschale. Alle Komponenten gemeinsam ergeben den typischen Aufbau eines Hühnereis. Die Befruchtung findet bereits im Eileiter der Henne statt. Die Dauer der Bebrütung beläuft sich bei idealen Bedingungen auf 19 bis 21 Tage (10).

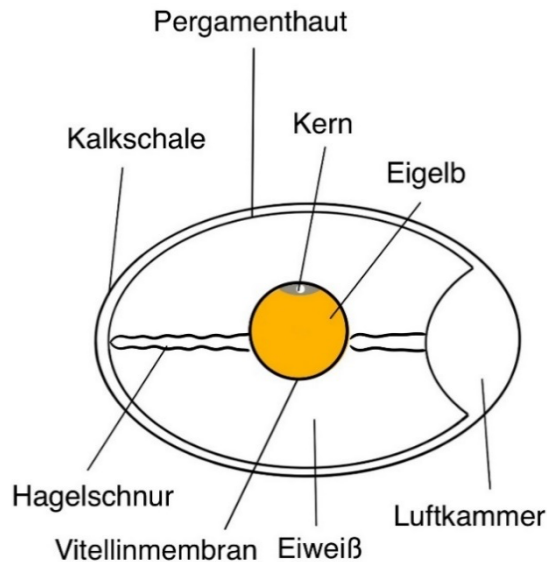


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Hühnereis

Die Skizze zeigt den Aufbau eines Hühnereis. Die eigentliche Eizelle, das Eigelb, ist umschlossen von der Vitellinmembran und enthält den Kern. Das Eigelb ist über die Hagelschnur mit der Pergamenthaut verbunden, die äußerste Begrenzung stellt die Kalkschale dar. Umgeben wird das Eigelb vom Eiweiß. (verändert nach W.A. Müller und M. Hassel, 2018)

Es gibt zwei Phasen, in welche sich die Entwicklung des Hühnerembryos einteilen lässt: die Primitiventwicklung und die Entwicklung der Organanlagen (11). Die Primitiventwicklung besteht aus der Blastogenese (Furchung), der Gastrulation (Keimblattbildung) und der Bildung der Primitivorgane (11). Bei der discoidalen Furchung entsteht am animalen Pol des Eis eine Keimscheibe (10). Diese besteht beim Legen des Eis aus ungefähr 60.000 Zellen (12). Zentral unterhalb der Keimscheibe bildet sich die Subgerminalhöhle. Deren obere Begrenzung wird als Epiblast, die untere Begrenzung als Hypoblast bezeichnet, der dazwischen entstehende flüssigkeitsgefüllte Hohlraum ist das Blastocoel. Während der Epiblast die Hauptrolle in der Entstehung des Embryos einnimmt, besteht die Funktion des Hypoblasts aus der Navigation später einwandernder Endo- und Mesodermalzellen (10). Aus der Verdickung des Epiblasts entsteht der Primitivstreifen, dessen Lage durch die Lagerung des Eis und damit durch die Schwerkraft bestimmt wird (12). Am kaudalen Ende dieses Primitivstreifens befindet sich der Primitivknoten, welcher als Organisationszentrum fungiert und die Bildung der Achsenorgane des Embryos induziert (12). Durch eine Wölbung der Keimscheibe und der Proliferation des Epiblasts entsteht am Primitivstreifen eine Auswölbung, die Primitivrinne. Durch diese Primitivrinne gelangen zwei Arten von Zellen in das Blastocoel: endodermale und mesodermale Zellen (10). Dadurch kommt es zur Ausbildung der

drei Keimblätter: die endodermalen Zellen wandern an die untere Begrenzung und bilden das Entoderm, die mesodermalen Zellen wandern zwischen Epiblast und Entoderm und bilden das Mesoderm und aus dem Epiblast entsteht das Ektoderm (10). Aus dem Ektoderm entstehen das Nervensystem und die Epidermis, aus dem Mesoderm Muskulatur, Endoskelett, Zirkulationsorgane und Bindegewebe, und aus dem Entoderm der Magen-Darm-Trakt mitsamt dessen Anhangsorganen. Die dafür benötigten Organanlagen entstehen in der darauffolgenden frühen Organogenese. Aus dem Entoderm entwickelt sich durch eine Auswölbung das Darmrohr, das Mesoderm gliedert sich in die Chorda, Somiten und Seitenplatten, aus dem Ektoderm entsteht das Neuralrohr (10).

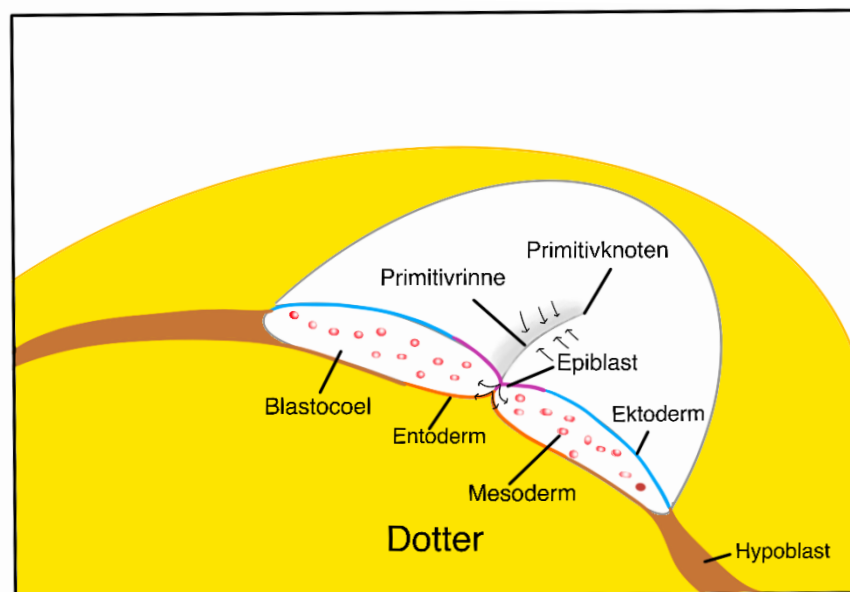


Abbildung 2: Schematische Abbildung der Keimblattbildung des Hühnerembryos

Der Epiblast und der Hypoblast umschließen das Blastocoel. Aus einer Verdickung des Epiblasts entstehen die Primitivrinne und der Primitivknoten. Über die Primitivrinne wandern endodermale und mesodermale Zellen in das Blastocoel. Während die endodermalen Zellen an die untere Begrenzung des Blastocoels wandern und das Entoderm bilden, wandern die mesodermalen Zellen zwischen Epiblast und Entoderm und bilden das Mesoderm. Aus dem Epiblast bildet sich das Ektoderm. (verändert nach Campbell und Reece, 2016)

2.1.1.1 Embryonalhüllen des Gallus gallus domesticus

Im Zuge der frühen Organogenese entstehen vier extraembryonale Membranen, das Chorion, das Amnion, die Allantois und die Dottersackmembran. Sie übernehmen vielfältige und für das Überleben und Heranwachsen des Embryos essenzielle Aufgaben. Neben ihrer physischen Schutzfunktion sind Teile dieser Membranen in der Lage, wichtige Bestandteile des maternalen Immunsystems in den Organismus des Embryos weiterzuleiten. Darüber hinaus sind sie für die Versorgung mit Nährstoffen sowie den

Abtransport von Abbaustoffen und den embryonalen Gasaustausch verantwortlich (11).

2.1.1.1.1 Dottersackmembran

Die Dottersackmembran entwickelt sich ab dem Embryo-Entwicklungstag (EDD) 2 aus dem embryonalen Darm (13, 14). Bis zu EDD 3 und 4 besteht die Dottersackmembran aus drei Zellschichten, die den Dotter umgeben. Dies sind eine endodermale Zellschicht, die dem Dotter aufliegt und eine Epithelzellschicht bildet, eine ektodermale Zellschicht, welche die äußerste Zellschicht bildet, und eine dazwischen liegende mesodermale Zellschicht (15). Der heranwachsende Dottersack kann in drei Bereiche aufgeteilt werden: die *Area pellucida*, welche dem Blastoderm entspringt, die *Area vasculosa*, die der am stärksten vaskularisierte Teil ist, und die *Area vitellina*, welche am weitesten distal gelegen und nicht vaskularisiert ist (16). Während zwischen EDD 2 und 6 die Oberfläche der *Area vasculosa* und *vitellina* gemeinsam zunimmt, kommt es zwischen EDD 6 und 12 zu einer Zunahme der *Area vasculosa* bei gleichzeitiger Abnahme der *Area vitellina* (14). Das Wachstum der Dottersackmembran (gemessen an Gewicht und Fläche) hat seinen Höhepunkt zwischen EDD 15 und 17 und nimmt bis zum Schlüpfen des Embryos ab (17).

Vor allem in puncto Nährstoffaufnahme hat die Dottersackmembran eine wichtige Funktion. Diese gelingt durch die Bereitstellung des Dotters über dessen Phagozytose durch die dem Dottersack angehörigen Epithelzellen. Neben der Phagozytose gelangt der Dotter ab EDD 5 zusätzlich über den Dottersackstiel in den Darm des Embryos (11). Zudem erfüllt die Dottersackmembran Aufgaben im Bereich der Erythropoese, Wirtsimmunität und des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels (15). Der von der Dottersackmembran umgebene Dotter ist reich an Wasser, Fett und Proteinen, wobei die jeweilige Zusammensetzung abhängig vom Alter der Legehennen ist (17).

2.1.1.1.2 Die gemeinsame Entstehung von Chorion und Amnion durch Abfaltung

Sowohl Chorion als auch Amnion entstehen aus einer Falte des Somatopleuras, der äußeren Schicht der Somiten (Mesoderm) und dem Ektoderm. Diese Falte hat ihren Ursprung anterior im Kopfbereich des Embryos und breitet sich nach dorsal aus. Der Prozess der Faltung erstreckt sich über 72 Stunden (18). Der anteriore Ausgangspunkt ist das Ektamnion, eine ektodermale Verdickung, welche die Abgrenzung zwischen Amnion- und Chorionsomatopleura darstellt. Sie wird im Verlauf der Fusion zur Kopf-

amnionfalte (18). Während sich diese Kopfamnionfalte nach posterior ausdehnt, entsteht die Schwanzamnionfalte und breitet sich nach anterior aus. Beim Zusammentreffen bilden beide die sero-amniotische Verbindung. Nach Abschluss der Fusion bringt der sich außen befindende Teil das Chorion und der nach innen gerichtete Teil das Amnion hervor (19).

Das Chorion hat eine schützende Funktion, indem es alle anderen in dem sich entwickelnden Ei befindlichen Strukturen mitsamt den extraembryonalen Membranen umgibt (20).

Das Amnion fungiert ebenso als natürlicher Schutz des Embryos, indem es diesen in eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle, die Amnionhöhle, einschließt (11). Das Amnion entsteht aus dem Ektoderm und der parietalen Mesodermschicht (12). Durch das Absondern von Fruchtwasser schützt der Amnion den Embryo vor Temperaturschwankungen, mechanischen Einflüssen und vor Dehydrierung (20). Ab EDD 17 dient das Fruchtwasser als Nahrung für den Embryo, wodurch die Entwicklung der Darmschleimhaut und die Vorbereitung auf das Schlüpfen vorangetrieben werden (21).

2.1.1.1.3 Allantois

Die Allantois entwickelt sich vor dem Ende der Amnionfaltung (11). An EDD 4 wächst diese, von der ventralen Wand des endodermalen Hinterdarms ausgehend, aus dem Embryo heraus in das extraembryonale Coelom. Dabei vergrößert sich besonders der distale Anteil in den ersten 4-10 Tagen der Entwicklung schnell und wird zur Allantoisblase (2). Die Allantois übernimmt funktionell die Aufgabe der embryonalen Harnblase (10).

2.1.1.2 Entwicklung und Aufbau der CAM

Die Allantoisblase nähert sich in Folge ihres Wachstums dem Chorion an, ehe beide zwischen EDD 4 und 5 zur CAM verwachsen (2). In dem Zeitraum zwischen dem EDD 10 und 12 erreicht die CAM eine Größe, in der sie sowohl den Dottersack als auch das gesamte Ei bedeckt. Zu diesem Zeitpunkt steht sie in ihrer gesamten Ausdehnung mit der inneren Schalenmembran in Verbindung (22). Die CAM ist stark vaskularisiert und über zwei der Allantois angehörige Arterien sowie eine Vene an das embryonale Blutsystem angeschlossen (23). Dabei ergibt sich für die CAM ein dreischichtiger Aufbau: Das äußere Chorionepithel ektodermalen Ursprungs liegt über einem mesenchymalen Stroma, welches wiederum das mesodermale Allantoisepithel überdeckt (24).

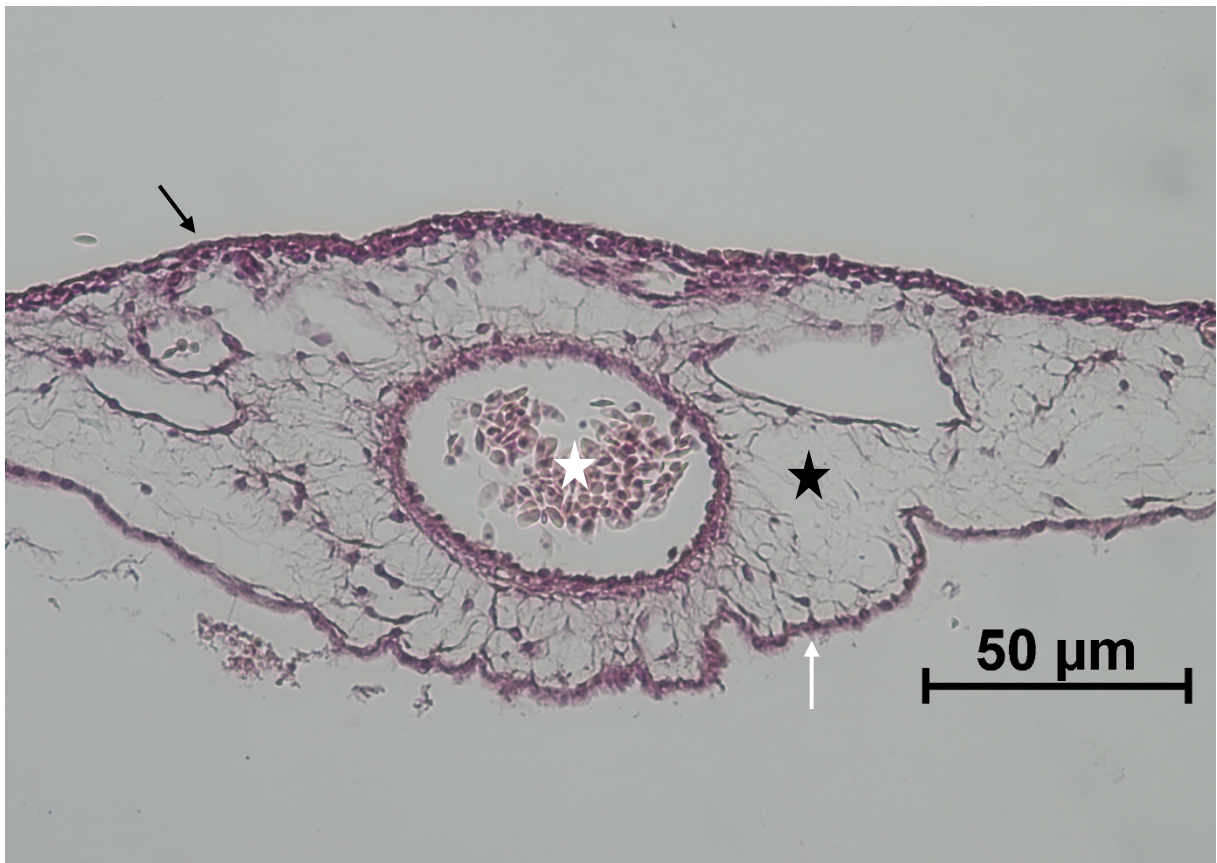


Abbildung 3: Mikroskopischer Querschnitt der dreischichtigen CAM an EDD 14, HE-Färbung

Der mikroskopische Querschnitt zeigt den typischen dreischichtigen Aufbau der CAM an EDD 14. Das zur Schale hin liegende äußere Chorionepithel (schwarzer Pfeil) besteht aus mehreren nicht differenzierten Zellschichten, das dem Embryo zugewandte Allantoisepithel (weißer Pfeil) ist ein- bis zweischichtig. Zwischen den Epithelschichten liegt das mesenchymale Stroma (schwarzer Stern). Mittig im Stroma befindet sich quer angeschnitten ein Blutgefäß (weißer Stern), in dessen Lumen Erythrozyten zu sehen sind.

Das Allantoisepithel besteht an EDD 8 zunächst aus einer einzelnen Schicht plattenförmiger, Fibroblasten-ähnlicher Zellen. Ab EDD 12 beginnt das Epithel, neue Zellen zu rekrutieren und eine zweite Zellschicht zu bilden. Eine weitere, dritte Zellschicht ist ab EDD 15 sichtbar, ehe bis EDD 18 drei bis vier gut differenzierte Zellschichten vorhanden sind. Auch das Chorionepithel entwickelt sich ähnlich dem Allantoisepithel. An EDD 8 ist die Zellschicht noch dünn, ehe ab EDD 11 Zellen aus dem Mesenchym integriert werden, sodass das Chorionepithel in seiner Dicke zunimmt. Dabei bilden sich jedoch keine differenzierten Zellschichten aus. Ab EDD 12 finden sich in diesen Schichten unter anderem Basalzellen, die kapillarbedeckenden Zellen und die villösen Hohlraumzellen (9).

Das Wachstum der CAM kann nach Makanya et al. (9) in drei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase erstreckt sich von EDD 4/5 bis 12 und ist das Stadium der Initiierung und Entwicklung der CAM. Die zweite Phase zwischen EDD 13 und 18 ist die Phase der Expansion und der Differenzierung, in der alle Komponenten bis zu einem Maximum an EDD 18 heranwachsen, ehe zwischen EDD 18 und 20 die Phase der Regression und Degeneration beginnt. Dabei beträgt das Volumen der CAM im Minimum an EDD 8 $0,47 \pm 0,11$ Kubikzentimeter (cm^3) und im Maximum an EDD 18 $2,05 \pm 0,27$ cm^3 . Gemäß der obigen Phaseneinteilung verringert sich das Volumen bis zu EDD 20 auf $1,6 \pm 0,47$ cm^3 (9). Diese Volumenabnahme und die ab EDD 18 erkennbaren Degenerationen sind Teil eines programmierten Prozesses in Vorarbeit auf das bevorstehende Schlüpfen des Hühnerembryos.

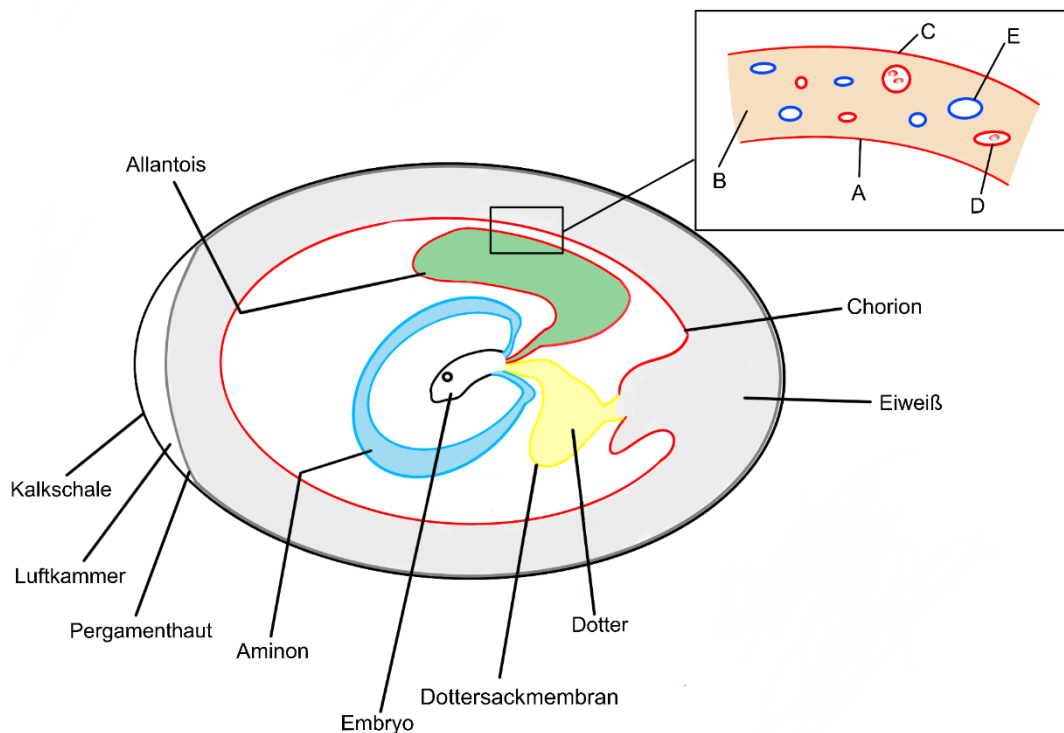


Abbildung 4: schematische Darstellung der Embryonalhüllen des *Gallus gallus domesticus*

Die Skizze zeigt die schematisch dargestellten Embryonalhüllen des Huhnes an EDD 14. Der vergrößerte Ausschnitt in der rechten oberen Ecke zeigt den dreischichtigen Aufbau der CAM mit A) Allantoisepithel, B) mesenchymalem Stroma, C) Chorionepithel, D) arteriellen Gefäßen und E) venösen Gefäßen. (verändert nach Feher, 1975)

2.1.1.3 Formation des Gefäßnetzes in der CAM

Die rasche Dynamik der CAM spiegelt sich auch in ihrer Gefäßneubildung wider. Aus der Nabelschnurarterie bilden sich primär zwei der Chorionallantois zugehörige Arterien, während sich die venöse Versorgung auf eine Hauptvene beläuft. Zwischen EDD 6 und 14 ist eine gesteigerte Bildung von versorgenden prä- und postkapillären Gefäßen zu verzeichnen (25). Die Formation des kapillären Netzes lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen. Zwischen EDD 4 und 6 findet eine Ausdehnung und Formation des Gefäßplexus statt. Dies geschieht dadurch, dass mesodermale Blutgefäße sich dem Ektoderm nähern und sich dort nach anfänglicher Vaskulogenese über die Neueinsprossung von Gefäßen weiter ausbreiten. Zwischen dem EDD 7 und 11 vergrößert sich das Netzwerk durch mikrovaskuläres Wachstum, während von EDD 12 bis 13 eine Ausdehnung ohne nennenswerte Komplexitätssteigerung stattfindet (23, 26, 27).

2.1.1.4 Funktionen der CAM

Die Hauptfunktion der CAM ist der embryonale Gasaustausch (7). Zusätzlich unterstützt sie den Abtransport von Natrium und Chlorid aus der Allantoishöhle, was dem Säure-Base-Haushalt dient (28). Ebenso wird ihr eine Rolle in der Bereitstellung des Kalziums, welches der Osteogenese dient, aus der Schale des Eis zugeschrieben (2).

2.1.2 Immunologische Aspekte des sich entwickelnden Hühnereis

Während ihrer embryonalen Entwicklung sind Hühnereier stetig Pathogenen ausgesetzt. Diese können sowohl durch den Legeprozess selbst als auch durch Umweltfaktoren wie Luftqualität oder den Ablageort sowie während der Inkubationsphase auf das Ei einwirken (29). Um die Ausbreitung von Bakterien und anderen Erregern innerhalb des Eis einzuschränken, sind verschiedene physische Barrieren sowie chemische Mechanismen vorhanden (29). Ebenso tragen einzelne humorale und zelluläre Elemente des angeborenen Immunsystems zum Schutz des Embryos bei (30). Die einzelnen Organe dieses Systems sind jedoch auch zum Zeitpunkt des Schlüpfens noch nicht vollends ausgebildet, sodass während der gesamten Eientwicklung keine vollständige Immunkompetenz vorliegt (31). Gleichermäßen verhält es sich mit der adaptiven Immunantwort. Auch die Komponenten der adaptiven Immunreaktion erwerben ihre volle Immunkompetenz erst im Verlauf der Bebrütung (30). Im Folgenden wird ein kurzer

Blick auf die Mechanismen des sich entwickelnden Immunsystems im Hühnerembryo gerichtet.

2.1.2.1 Physische und chemische Barrieren

Betrachtet man den allgemeinen Aufbau eines Hühnereis, vergleiche Abschnitt 2.1.1, so lassen sich aus diesem drei physische und chemische Barrieren benennen: die Kalkschale, das Eiweiß und die Vitellinmembran. Die äußerste Barriere ist die Kalkschale, die das Ei vor physischen und mikrobiellen Einflüssen schützt (29). Die zweite Barriere stellt das Eiweiß dar, das auf verschiedene Mechanismen zurückgreift. Einerseits beinhaltet es verschiedene antimikrobielle Proteine und Peptide, andererseits schützt das Eiweiß vor Pathogenen durch die Modulation von pH-Wert und Viskosität (29). Kurz nach Eiablage steigt der pH-Wert des Eiweißes von 7,6 auf 9,0 an und wird basischer (32). Dies wirkt sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid (33). Im Verlauf der Bebrütung lässt sich eine Abnahme dieses Wertes auf 7,5 bis EDD 12 beobachten (29). Zudem sorgt die Viskosität des Eiweißes für eine eingeschränkte Mobilität pathogener Keime (29, 34). Die Vitellinmembran stellt die dritte Barriere dar. Dabei ist sie vor allem physischer Natur, indem sie das Eigelb vom Eiweiß trennt (29). Ferner konnten in ihr 35 Proteine nachgewiesen werden, denen antimikrobielle Eigenschaften zugeschrieben werden (35). Das Eigelb selbst enthält wenige antimikrobielle Proteine, vorherrschend dabei ist das maternale Immunglobulin Y (IgY). Dieses wird über die Dottersackmembran in den embryonalen Kreislauf transportiert (29). Dieser Transport beginnt an EDD 7 in einem geringen Maße von $<100 \mu\text{g}/\text{Tag}$ und nimmt erst drei Tage vor dem Schlüpfen mit $>600 \mu\text{g}/\text{Tag}$ merklich zu (36). Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Schutz des Embryos durch das IgY vor allem in den ersten Tagen der Entwicklung eher als gering einzustufen ist.

2.1.2.2 Angeborenes Immunsystem

Ähnlich zum humanen Immunsystem konnten im heranwachsenden aviären Embryo verschiedene Proteine und Immunzellen beobachtet werden, die Teil der unspezifischen Immunantwort sind. Dazu gehören neben Antigen-präsentierenden Zellen wie embryonalen Makrophagen und dendritischen Zellen beispielsweise auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (30).

Erstgenannte embryonale Makrophagen konnten zwischen EDD 2 und 4 im Dottersack, an EDD 4 und 5 in Blutgefäßen sowie auf der Chorionoberfläche der CAM als

Reaktion auf das Auflegen eines Silikonschlauches beobachtet werden (37-39). In Leber und Niere des sich entwickelnden Embryos konnten Makrophagen an EDD 12 und 16 beobachtet werden (30, 40). Es konnte eine erhöhte Aktivität der *Stickstoffmonoxid-Synthase 2* (NOS2/iNOS) in den embryonalen Makrophagen nach Kontakt mit LPS und Interferon-Gamma festgestellt werden, ähnlich wie bei humanen Makrophagen (41). Nach Induktion produziert die NOS2 in Makrophagen eine hohe Menge an Stickstoffmonoxid, welches zytotoxisch wirkt. Ferner konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie in der CAM, nach Aufbringung angiogener Wachstumsfaktoren auf die CAM, die Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP13) exprimieren. Da Makrophagen einen Teil der zellulären Immunabwehr des Hühnerembryos darstellen, ermöglicht das Messen der Expression des MMP13 Rückschlüsse auf eben jenen Teil der angeborenen Immunabwehr (39). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Reduktion embryonaler Makrophagen in Hühnerembryonen durch eine Clodronat-Liposom-Injektion mit einer verringerten Angiogenese einhergeht (42). Unklar blieb in diesem Zusammenhang, welcher zelluläre Mechanismus diesem anti-angiogenen Effekt zugrunde liegt. Neben einer direkten Interaktion embryonaler Makrophagen mit den Kapillarsprossen ist dabei auch eine Beteiligung des MMP13 denkbar. Pro-angiogene Eigenschaften des MMP13 werden im Kapitel 2.2.9 näher erläutert.

Neben den Makrophagen konnten weitere in der Embryonalentwicklung auffindbare Antigen-präsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems beobachtet werden. Während CD45-positive Zellen bei einem ausgewachsenen Huhn aus dem Knochenmark stammen, entspringen sie in der embryonalen Entwicklung dem Dotter, wo ihre Vorläufer bereits ab EDD 2 beobachtet werden konnten (30, 43). Auch beobachtet werden konnten mögliche Vorläufer von Langerhanszellen in der Epidermis ab EDD 8 und in der Bursa fabricii, dem Zökum und der Milz ab EDD 10 (43). Dendritische Vorläuferzellen konnten im Thymus ab EDD 11 nachgewiesen werden (44). Neben den Antigen-präsentierenden Zellen konnten auch NK-Zellen in der Milz an EDD 14 nachgewiesen werden (30). Zum Erkennen und weiteren Prozessieren pathogen-assoziiertes molekularer Muster wie Lipoproteinen oder Lipopolysacchariden benötigen Antigen-präsentierende Zellen und Granulozyten verschiedene Oberflächenproteine (45). Eines dieser Proteine sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). TLRs konnten im embryonalen Gewebe des Huhns ab EDD 3 beobachtet werden (46). Besonders in der Leber

des Embryos konnte eine gesteigerte Expression der TLRs an EDD 12 festgestellt werden (30).

2.1.2.3 Adaptive Immunabwehr

Auch in puncto adaptive Immunreaktion gibt es zwischen dem Haushuhn und dem humanen Immunsystem Parallelen. So sind es bei Hühnern ebenfalls T- und B-Zellen, die für die adaptive Immunkompetenz eine entscheidende Rolle spielen. Sowohl die T- als auch die B-Zellen gelten jedoch erst ab EDD 18 als vollständig immunkompetent. Ab EDD 11 und 12 findet eine erste B- und T-Zellentwicklung statt, die B-Zelldifferenzierung erst nach EDD 15 (29, 47, 48). Somit spielt die adaptive Immunabwehr in dem Zeitraum, in dem das CAM-Assay üblicherweise durchgeführt wird, noch keine Rolle für die Immunkompetenz des heranwachsenden Embryos.

2.2 Angiogenese

2.2.1 Definition

Der Begriff Angiogenese leitet sich aus dem Lateinischen ab und setzt sich aus den Worten *angeion* (Gefäß) und *genesis* (Entstehung) zusammen. Er bezeichnet die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen. Die Angiogenese ist von der Vaskulogenese abzugrenzen, bei der Blutgefäße *de novo*, ohne vorhandenes Gefäßnetzwerk aus Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen (49). Dabei spielt die Angiogenese eine bestimmende Rolle in physiologischen Prozessen wie der Wundheilung oder Geweberegeneration, aber auch in pathologischen Prozessen wie dem Tumorwachstum und der Metastasierung (50).

2.2.2 Ablauf der Angiogenese

Der Prozess der Angiogenese und die damit einhergehende Gefäßneubildung ist von großer Komplexität geprägt und unterliegt der Regulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren. Auf ein proangiogenes Signal hin, unter anderem ausgelöst durch die Gruppe der *vascular endothelial growth factors* (VEGFs), der Angiopoetine (Angs) oder auch des *transforming growth factor- β* (TGF- β), kommt es zu einem Abbau der umliegenden Extrazellulärmatrix (EZM) und der Proliferation von Kapillarsprossen (51). Ein häufig beobachteter Anreiz für die Einsprossung neuer Gefäße stellt eine hypoxische Umgebung dar, in der eine ausreichende Versorgung des umliegenden Parenchyms mit O₂ nicht gewährleistet ist. Auf die Hypoxie hin induziert ein Komplex verschiedener Transkriptionsfaktoren, darunter der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF1), die vermehrte Aktivierung der verschiedenen Wachstumsfaktoren, vor allem des *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) (52). Neben dieser sprossenden Angiogenese ist eine weitere Art der Angiogenese bekannt, die spreizende Angiogenese (intussuszeptive Angiogenese), bei der versucht wird, durch Spreizung eines vorhandenen Gefäßes ein weiteres zu generieren (53). Im Folgenden wird ein gezielter Blick auf einige der im Prozess der Angiogenese beteiligten Wachstums- sowie Transkriptionsfaktoren, Enzyme und andere regulatorische Proteine gerichtet sowie deren Funktion beleuchtet.

2.2.3 Der *Vascular endothelial growth factor* als Schlüsselfaktor der Angiogenese

Wie im vorangegangenen Abschnitt 2.2.2 beschrieben gilt die Wachstumsfaktorenfamilie der VEGFs als einer der Hauptakteure im Rahmen der Gefäßneubildung. Die Gruppe umfasst, neben den im Menschen vorhandenen VEGF-A, -B, -C, -D, das virale VEGF-E aus dem Parapoxvirus und das im Schlangengift entdeckte VEGF-F (54). Die VEGFs nehmen diverse Funktionen im Rahmen der Neoangiogenese wahr, darunter die Erhöhung der vaskulären Permeabilität, die Förderung der Endothelzellproliferation, -migration und des -überlebens sowie die proteolytische Zersetzung der EZM (55, 56). Die VEGFs interagieren mit drei verschiedenen Tyrosinkinase Rezeptoren, dem *vascular endothelial growth factor-receptor 1, 2* und 3 (VEGFR1, 2 und 3). Maßgeblich beteiligt an den Prozessen der Angiogenese sind hierbei der VEGFR2, welcher auch unter dem Synonym *kinase insert domain receptor* (KDR) bekannt ist, und der VEGFR1, der auch *fms related tyrosin kinase 1* (FLT1) genannt wird (57). Beide sind verantwortlich für die Proliferation und Migration von Endothelzellen (58). Der VEGFR3 hingegen, dessen Liganden das VEGF-C und -D sind, ist im adulten Gewebe spezifisch nur in lymphatischen Endothelzellen vorhanden, die einzige Ausnahme stellen wenige gefensterte Blutkapillaren dar, sodass ihm vor allem im Rahmen der Lymphangiogenese eine bedeutende Rolle zugesprochen wird (55, 59).

Für das Verständnis des genauen Ablaufs der sprossenden Angiogenese auf zellulärer Ebene wird nachfolgend ein gezielter Blick auf einen der Schlüsselakteure, das VEGF-A, gerichtet. Zentraler Interaktionspartner des VEGF-A ist das HIF1, auf welches im Abschnitt 2.2.4 ebenfalls detaillierter eingegangen wird. Wie bereits im Abschnitt 2.2.2 angeschnitten ist der Ausgangspunkt der folgenden Signalkaskade, und damit häufiger Auslöser für die Bildung neuer Gefäße, das Vorliegen einer hypoxischen Umgebung. In Parenchymzellen des jeweiligen Gewebes führt diese zur Aktivierung des HIF1, welches nachgeschaltet das VEGF-A hochreguliert. Dieses VEGF-A bindet an den VEGFR2, welcher sich in hoher Dichte auf den Zellfortsätzen, den Filopodien, sogenannter *endothelial tip cells* befindet (60). Die Filopodien ebnen der wachsenden Kapillare den Weg durch die EZM in Richtung des VEGF-A Stimulus. Dies geschieht, indem sie proteolytische Enzyme sezernieren, die zum Abbau der EZM führen. Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) nehmen hierbei eine führende Rolle ein, weshalb im Abschnitt 2.2.5 ebenfalls auf diese Enzymgruppe eingegangen wird (61). Die abschließende Entstehung eines neuen Gefäßes geschieht dadurch, dass sogenannte

endothelial stalk cells den *endothelial tip cells* folgen, sich anschließend vermehren und ein Lumen bilden (62).

2.2.4 Hypoxie induzierter Faktor 1 (HIF-1)

Das vorherig als zentraler Interaktionspartner des VEGF-A im Rahmen der sprossenden Angiogenese erwähnte HIF1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher für die Regulation von über hundert verschiedenen Genen zuständig ist (63). Er ist sauerstoffsensitiv und reguliert Sauerstoffbedarf und -versorgung von Zellen (64). Er besteht aus zwei Untereinheiten, der beta (HIF-1 β) und der alpha Untereinheit, wobei letztere wiederum drei Isoformen, 1 alpha (HIF-1 α) sowie 2 alpha (HIF-2 α) und 3 alpha (HIF-3 α), hat (65, 66).

Ehe ein gezielter Blick auf die dem HIF1 nachgeschaltete Signalkaskade gerichtet wird, wird zunächst dessen eigene Aktivierung beschrieben. Bei vorherrschender Normoxie bindet der *Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor* an das hydroxylierte HIF-1 α und vermittelt dessen Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (67-69). Unter hypoxischen Bedingungen bleibt der Abbau des HIF-1 α aus. Unter steigender Konzentration dimerisiert es mit dem HIF-1 β und bildet ein Heterodimer, welches in den Nukleus der Zelle gelangt und dort an die sogenannten *hypoxia response elements* (HREs) spezifischer Gene bindet und damit deren Transkription steigert. Bei den HREs handelt es sich um Promoterregionen. Zum ersten Mal beschrieben wurden diese im Promoter des Erythropoetin (EPO) Gens (70).

Ziel dieser Transkriptionssteigerungen ist eine Vielzahl an Genen. Die Funktion des HIF1 liegt darin, die Zelle schnell an die hypoxischen Umgebungen anzupassen. So nimmt das HIF1 neben seiner Rolle in der Angiogenese unter anderem Einfluss auf die Erythropoese, den Glukosestoffwechsel sowie Zellüberleben und -proliferation (71). Den Haupteinfluss auf die Erythropoese nimmt das HIF1 über eine gesteigerte EPO-Expression, welche in einer gesteigerten Produktion von Erythrozyten und damit in einem gesteigerten Sauerstofftransport mündet (70). Der Glukosestoffwechsel wird dahingehend beeinflusst, dass das HIF1 die Expression diverser Enzyme des Glukosestoffwechsels hochreguliert, darunter die des Glukosetransporters 1 (72). Die gesteigerte Expression der mit dem Glukosestoffwechsel verbundenen Enzyme wird dahingehend benötigt, dass Zellen unter Hypoxie auf einen anaeroben Stoffwechsel umstellen. Zellüberleben und -proliferation werden durch eine gesteigerte Expression des

transforming growth factor alpha (TGF α) sowie des *insulin growth factor-2* erreicht (73, 74).

Und auch seiner leitenden Funktion in der Angiogenese liegt derselbe Mechanismus zugrunde: die Hochregulierung diverser für die Gefäßneubildung benötigter Gene. Dabei sind insbesondere die unter Hypoxie und der obig beschriebenen Akkumulation des HIF1 gesteigerte Expression des VEGF sowie die gesteigerte Expression der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2), die den für die Angiogenese notwendigen Abbau der EZM betreibt, erwähnenswert (75-77).

2.2.5 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Matrixmetalloproteinasen sind Zink-abhängige Endopeptidasen. Abgesehen von ihrem Beitrag zum Abbau der EZM während der Angiogenese spielen sie auch eine bedeutsame Rolle bei der Apoptose und der Wundheilung (78). Im Rahmen der im Kapitel 2.2.2 beschriebenen sprossenden Angiogenese werden sie von den *endothelial tip cells* sezerniert und führen zum Abbau der EZM (61). So beschränken sich in ihrer Funktion als Peptidasen ihre Substrate nicht ausschließlich auf Proteine der EZM. Deren Anteil ist mit 27% verglichen mit nicht-EZM-Bestandteilen, die 73% der Substrate ausmachen, vergleichsweise gering (79). Zu diesen nicht-EZM-Bestandteilen zählen unter anderem Substrate der Zelloberfläche und intrazelluläre Substrate (79). In Wirbeltieren sind 28 MMPs bekannt, davon sind 23 in humanem Gewebe und 14 davon in Blutgefäßen exprimiert (78, 80).

2.2.6 Angiopoetine

Eine weitere Wachstumsfaktorengruppe, welche Einfluss auf die Angiogenese nimmt, sind die Angs. Die Funktionen dieser Angs sind vielfältig. Neben den Gefäß-stabilisierenden Funktionen sowie der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase, der Kontrolle der vaskulären Permeabilität und der Regulation von Entzündungsreaktionen sind sie vor allem ein wichtiger Bestandteil der Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen (81-83). Die Familie der Ang umfasst die Angiopoetine 1-4, wobei das Angiopoetin 1 (Ang1) und das Angiopoetin 2 (Ang2) die am ausführlichsten beschriebenen Wachstumsfaktoren dieser Klasse sind. Die *tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains 1 und 2* (TIE1, TEK/TIE2) fungieren als deren Rezeptoren, sodass in dem Zusammenhang häufig von dem Ang/TIE-Signalweg die Rede ist (84). Das TEK wird vor

allem auf Endothelzellen exprimiert, wenngleich sein Vorhandensein auch in hämatopoetischen Stammzellen beschrieben wurde (85, 86). Auch der TIE1 ist auf Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, ist jedoch weitaus weniger erforscht als das TEK (86-88). Der Ang/TEK-Signalweg trägt maßgeblich zum Überleben und der Proliferation von Endothelzellen bei (84). Während das Ang1 als Agonist des TEK gilt, fungiert das Ang2 als kompetitiver Antagonist des Ang1 am TEK (89), kann jedoch in hoher Konzentration auch als Agonist agieren (90). Die Rolle des Ang2 ist derzeit noch nicht vollends verstanden. Je nach vorherrschendem Milieu hat das Vorhandensein von Ang2 verschiedene Effekte. Während Ang2 in Anwesenheit des VEGF beispielsweise proangiogene Effekte hat, führt es unter Inhibition des VEGF zum Zelltod von Endothelzellen (91).

2.2.7 Transforming growth factor beta (TGF- β)

Das Zytokin TGF- β gehört der TGF- β -Superfamilie an, der unter anderem auch Aktive, Knochenmorphogenetische Proteine und Wachstumsdifferenzierungsfaktoren zuzuordnen sind (92). Das TGF- β hat drei Isoformen, TGF- β 1-3 (93). Es wird in einem latenten Komplex sezerniert und bis zu seiner Aktivierung in der EZM gespeichert (92). Die Funktionen des TGF- β sind stark kontextabhängig. Es gilt als ein bifunktionaler Regulator, der entweder die Zellproliferation hemmt oder sie anregt (94). So spielt er eine Rolle in der Kontrolle der Wundheilung, des Immunsystems, der frühen Embryogenese, der adulten Hämostasie und letztlich auch der Angiogenese (94-96). Auch in Endothelzellen konnten TGF- β bifunktionelle Eigenschaften zugeschrieben werden. Je nach Signalkaskade führt es entweder zu einer Hemmung der Angiogenese durch Hemmung der Endothelzellproliferation und -migration oder zur Progression der Angiogenese durch Förderung eben jener Endothelzellproliferation und -migration (96-98). Die vielfältige Rolle des TGF- β beschränkt sich nicht nur auf physiologische Prozesse, sodass TGF- β auch wegen seiner Schlüsselrollen im Kontext von pathologischen Prozessen wie Dysfunktionen des Immunsystems, Fibrosen und Krebserkrankungen in den Fokus der Forschung gerückt ist (92). Durch diese Erkenntnisse steht das TGF- β auch im Fokus der Untersuchungen rund um die Tumorprogression. Während es in frühen Krebsstadien noch als Tumorsuppressor agiert, unterstützt es in der voranschreitenden Tumorgenese die Tumorprogression (99). Da seine proangiogenen Eigenschaften überwiegend im Rahmen und Kontext der Tumorprogression beobachtet werden konnten, wird dieser Aspekt in dem Abschnitt 2.2.10 tiefergehend beleuchtet.

2.2.8 *T-Box transcription factor 1*

Der *T-Box transcription factor 1* (TBX1) ist ein Transkriptionsfaktor, der der Familie der T-Box Transkriptionsfaktoren angehört. Diese sind bekannt für ihre bedeutende Rolle in der Embryonalentwicklung (100). So ist das TBX1 mitverantwortlich für die Entwicklung des Schlundapparats, die kardiale Entwicklung und die Entwicklung der Großhirnrinde (101). Größere Bekanntheit erlangte das TBX1 durch seine Mitwirkung an dem Mikrodeletionssyndrom 22q11.2 (102, 103). Ferner wird dem TBX1 eine Rolle in der vaskulären Entwicklung zugesprochen (101). Dabei scheint es vor allem in mesodermalen Endothelzellvorläufern exprimiert zu werden und weniger in differenzierten Endothelzellen (104-107). In Untersuchungen mit Nagern konnte gezeigt werden, dass das TBX1 in Endothelzellen des Hirns vorhanden ist. Bei Inaktivierung des TBX1 konnten Missbildungen der Hirngefäße beobachtet werden, was auf eine Beteiligung von TBX1 an der Regulation der Gefäßbildung des Hirns hinweist (107). Des Weiteren spielt das TBX1 eine Rolle in der Lymphangiogenese. Die Inaktivierung von TBX1 in Endothelzellen führte zu einem Verlust von Lymphgefäßen in verschiedenen Geweben, Ursache dafür war eine verringerte VEGFR3-Expression (105).

2.2.9 Angiogenese in der CAM

Da die CAM eine einfache Zugänglichkeit zu einem stark vaskularisierten kapillärem Netzwerk bietet, ist sie in den Fokus für pro- und antiangiogene Untersuchungen gerückt. Dabei sind jedoch die molekularbiologischen Grundlagen der Angiogenese in der CAM selbst bisher unzureichend erforscht. Im Folgenden werden bestehende Publikationen, die die Expression oder die Auswirkungen der Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren auf die sich entwickelnde CAM untersucht haben.

Marinaccio et al. (108) untersuchten die relative Expression der proangiogenen Faktoren VEGF-A, des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF2), des Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), des HIF-1 α , des HIF-2 α sowie des Ang1 und des antiangiogenen Faktors Endostatin per RT-qPCR. Dabei stellten sie die relative Expression dieser Gene an EDD 7, 12 und 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe an EDD 18 dar. Die Expression des VEGF-A, FGF2 und HGF verringerte sich von dem Peak an EDD 7 ausgehend konstant, während die Expression des Endostatin konstant stieg und ein Maximum an EDD 14 erreichte. Ang1, HIF-1 α sowie HIF-2 α stiegen bis EDD 12 auf ein Maximum, und verzeichneten zu EDD 14 hin eine geringe Abnahme.

Auch Makanya et al. (9) stellten Untersuchungen verschiedener Wachstumsfaktoren per RT-qPCR in der CAM an. Sie stellten die relative Expression der proangiogenen Faktoren VEGF-A, HIF-1 α und VEGFR2 an den EDD 11,13,15,18,20 und des Zytokins CXC-Motiv-Chemokin 12 (SDF-1) an den EDD 11,13 und 15 im Vergleich zur relativen Expression an EDD 8 dar. Dabei wiesen das VEGF-A sowie das HIF-1 α ein Maximum an EDD 11 und 20 sowie ein Minimum an EDD 15 auf. Für die VEGFR2 Expression konnte ein Peak an EDD 11 verzeichnet werden, ab dem die Expression sich dann bis EDD 20 konstant verringerte. Gleichermäßen verhielt es sich beim SDF-1, wobei dessen Expression nur bis einschließlich EDD 15 untersucht wurde.

Tabelle 1: Übersicht bereits per RT-qPCR detektierter Angiogenese-assoziiierter Faktoren in der CAM

Gen	Untersucht von
VEGF-A, FGF2, HGF, HIF-1α, HIF-2α, Ang1, Endostatin	Marinaccio et al. (2013)
VEGF-A, HIF-1α, VEGFR2, SDF-1	Makanya et al. (2016)
MMP13	Zijlstra et al. (2004)

Ein weiteres Enzym, das in der CAM mit der Angiogenese in Verbindung gebracht wird und untersucht wurde, ist das MMP13. Auf einen angiogenen Stimulus hin fiel die Induktion und Expression, detektiert per RT-qPCR, des MMP13 zusammen mit der Einsprossung neuer Gefäße (39). Darauf, dass das MMP13 einen möglichen positiven Einfluss auf die Angiogenese nimmt, könnte auch die Beobachtung hinweisen, dass MMP13 dazu in der Lage ist, die VEGF-Sekretion von Fibroblasten und Endothelzellen zu fördern (109).

Ein weiterer interessanter Wachstumsfaktor ist das Zytokins TGF- β . Wie bereits in Kapitel 2.2.7 beschrieben, ist das TGF- β , auch im Hinblick auf die Angiogenese, sehr vielfältig, agiert es doch einerseits hemmend andererseits auch fördernd hinsichtlich der Gefäßneubildung. Im Hinblick auf die CAM konnten Yang et al. (110) im Jahr 1990 zeigen, dass das TGF- β 1 in der CAM mit einer gesteigerten Angiogenese einhergeht. Dazu legten die Forschenden mit dem Wachstumsfaktor imprägnierte Methylcellulose-Scheiben an EDD 9 auf die CAM auf. Dabei wurden verschiedene Dosierungen des TGF- β 1 verwendet, es kamen 10ng, 50ng und 100ng des Wachstumsfaktors zum Einsatz. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, der eine native Methylcellulose-Scheibe

aufgelegt wurde, konnten dosisabhängige positive angiogene Effekte beobachtet werden. Das TGF- β 1 führte zu einer Zunahme der Arteriolen und Venolen um die Methylzellulosescheibe herum, dabei war dieser Effekt stärker, je höher die Dosis gewählt wurde. Auf mikroskopischer Ebene konnten Kapillarsprossen und eine erhöhte Endothelzellichte nach 16 Stunden festgestellt werden.

2.2.10 Tumorassoziierte Angiogenese

Die Angiogenese nimmt eine bedeutende Rolle im Rahmen der Tumorprogression und -metastasierung ein und ist in den letzten Jahrzehnten immer wieder für therapeutischen Interventionen ins Auge gefasst worden. Da die Signalwege der Angiogenese komplex sind und viele Wachstumsfaktoren Einfluss darauf nehmen, gibt es diverse Schnittstellen, die eine Möglichkeit für mögliche medikamentöse Interventionen bieten.

Tumorzellen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus, weshalb sie auf ein schnell wachsendes und ausgedehntes vaskuläres Netzwerk angewiesen sind (49). Bei der Tumorprogression lassen sich zwei Phasen unterscheiden: die avaskuläre Phase, bei der Tumore durch ein Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose nur bis zu einem Durchmesser von 1-2 mm anwachsen, und die vaskuläre Phase mit exponentiellem Tumorwachstum (111). Zwischen beiden Phasen findet der *angiogenic switch* statt (111). Sofern es zu einem *angiogenic switch* kommt, geschieht die Angiogenese der Tumore über verschiedene Arten, die über die physiologischen Möglichkeiten intakten Gewebes hinausgehen. Neben der sprossenden und intussuszeptiven Angiogenese generieren Tumore über postnatale Vaskulogenese und vaskuläres Mimikry neue Gefäße und die Differenzierung von Tumorstammzellen zu Endothelzellen ist ebenfalls möglich (112). Unter vaskulärem Mimikry versteht sich die Nachahmung der Angiogenese durch Formung gefäßähnlicher Strukturen (113). Eine tragende Rolle dabei nimmt das vaskulär-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin / CDH5) ein. Dieses Zelladhäsionsmolekül gilt, zusammen mit der fokalen Adhäsionskinase und dem β -Catenin, als Regulator der tumoralen Mikroumgebung und ist in der Lage, das vaskuläre Mimikry zu fördern (114).

Bei der Rekrutierung neuer blutversorgender Strukturen von Tumoren nimmt vor allem das VEGF-A eine Hauptrolle ein (115). Mit der Größenzunahme des proliferierenden Tumors entsteht im Inneren des Tumors, bedingt durch die wachsende Entfernung der Zellen zum nächstgelegenen versorgenden Blutgefäß, eine zunehmend ausgeprägte Hypoxie. Diese führt, durch eine gesteigerte HIF-1 α Konzentration, zu einer erhöhten

Expression des VEGF-A (115). In einem humanen Glioblastom konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das VEGF mRNA Level in nekrotischen und minder vaskularisierten Bereichen am höchsten ist (116). Gerade wegen dieser bedeutenden Rolle im *angiogenic switch* wurde das VEGF-A als Target für eine Inhibition im Rahmen der Tumorthherapie herausgedeutet. Im Jahr 1993 gelang es, VEGF-A durch monoklonale Antikörper gezielt zu inhibieren (117). Im Jahr 2004 wurde der erste monoklonale Antikörper, Bevacizumab, durch die *U.S. Food and Drug Administration* für die Erstlinien-therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms nach erfolgreicher klinischer Erprobung zugelassen (118). Der Erfolg der Inhibitionstherapie des VEGF-A bleibt derzeit jedoch hinter den Erwartungen zurück. Neben einer hohen Bandbreite an Nebenwirkungen, wie Hämorrhagie, Bluthochdruck oder Atherosklerose, gibt es Patienten, die auf die Inhibitionstherapie nicht ansprechen (112). Das fehlende Ansprechen der Medikation auf die Inhibition des VEGF-A hängt dabei vor allem mit dem Vorhandensein verschiedener anderer, alternativer Wachstumsfaktoren zusammen, darunter Faktoren wie der Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) (119). Über diese alternativen Signalwege gelingt dem Tumor häufig trotz Inhibition von VEGF-A die Bildung neuer Gefäße (120).

Ein anderer Faktor, der in Tumoren erhöht vorzufinden ist, ist das Ang2. Ihm wird eine Rolle in der Steigerung des Tumorwachstums, dessen Metastasierung sowie der tumorassoziierten Angiogenese zugesprochen (81). Diverse selektive sowie nicht selektive Inhibitoren des Ang2, sowie Kombinationspräparate zur Hemmung von VEGF-A und Ang2 werden derzeit in klinischen und vorklinischen Studien getestet und zeigen vielversprechende Ergebnisse (112).

Gleichermaßen konnte eine Überexpression des MMP13 in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Dem MMP13 als Kollagenase mit der Fähigkeit, Kollagen sowie EZM zu spalten und dadurch eingebettete Wachstumsfaktoren freizusetzen, werden unterstützende Rollen in der tumorassoziierten Angiogenese, Tumorentstehung, -progression und -metastasierung zugeschrieben (121).

Ebenso konnte eine vermehrte Expression des TGF- β in Tumorzellen festgestellt werden (122). In diesem Kontext wurden verschiedene Wege beobachtet, durch die es dem TGF- β möglich ist, der Angiogenese und damit der Progression von Tumoren zuzuspielen. So konnte festgestellt werden, dass das HIF-1 α und TGF- β 1 gemeinsam die Expression des VEGFs in Tumorzellen fördern (123). Gleichermaßen bewirkt das

TGF- β 1 im oralen Plattenepithelkarzinom eine vermehrte Sezernierung des VEGFs in Makrophagen (124). Neben den genannten Auswirkungen auf das VEGF konnte eine durch das TGF- β vermehrte Expression des MMP2 und -9 sowie eine verminderte Expression der *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs), welche als Gegenspieler der MMPs agieren, festgestellt werden (125). Des Weiteren steigert das TGF- β durch Koordination der *Sine oculis homeobox homolog 1* die Expression des VEGF-C, was zu einer gesteigerten Lymphangiogenese und Lymphknotenmetastasierung führt (126).

2.3 Strahlentherapie und ihre Auswirkung auf Angiogenese-assoziierte Faktoren

Wie bereits ausführlich im vorherigen Abschnitt beschrieben bieten verschiedene Angiogenese-assoziierte Faktoren Interventionsmöglichkeiten, um in die Tumor-assoziierte Angiogenese einzugreifen. Ziel dabei ist, den Tumor von der Blutversorgung abzuschneiden und dadurch den Zelltod der Tumorzellen zu induzieren (127). Viele der anti-angiogenen Therapien verursachen dabei eine Hypoxie des Tumors (128). Entgegen des erhofften hypoxisch bedingten Zelltodes stellte sich jedoch heraus, dass die tumorale Hypoxie auch vielfältige Auswirkungen hat, die zum Tumorüberleben beitragen können. So fördert die tumorale Hypoxie unter anderem die Invasivität und Metastasierung, führt zu überlebensfördernden Veränderungen der Genexpression und trägt über diverse Mechanismen zur Therapieresistenz gängiger zytotoxischer Anwendungen bei (128-131). Eine dieser Anwendungen ist ionisierende Strahlung in Form von Strahlentherapie. Ziel dabei ist die Schädigung der Tumorzellen durch Mechanismen wie Apoptose, Nekrose, Autophagie und Seneszenz durch die mitotische Katastrophe (132). Hauptziel der Strahlung ist hierbei die DNA. Durch die Strahlung können entweder geladene Teilchen direkt die DNA oder Wassermoleküle ionisieren, welche dann über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies indirekt die DNA schädigen (133). In hypoxischer Umgebung jedoch entfällt diese Bildung reaktiver Sauerstoffspezies größtenteils, wodurch bis zu 3-fach höhere Strahlendosen nötig würden, um denselben zytotoxischen Effekt zu erzielen (128). Weitestgehend unerforscht ist dabei, welche Wirkung ionisierende Strahlung auf Genexpressionsebene hat. Ein tiefergehendes Verständnis für die Interaktion zwischen ionisierender Strahlung und Angiogenese-assoziierten Faktoren birgt ein hohes Potenzial, therapeutische Interventionsmöglichkeiten im Hinblick auf ein mögliches Verbessern der Strahlenantwort zu identifizieren. Die

folgenden Abschnitte behandeln bisherige Erkenntnisse über die direkte Wirkung von Strahlung auf verschiedene Faktoren, die für die Angiogenese wichtig sind. Darin eingeschlossen sind Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie Enzyme und andere regulatorische Proteine.

Gil Marques et al. (134) untersuchten *in vivo* Endothelzellen von peritumoralem Gewebe bei Patienten mit fortgeschrittenem rektalen Karzinom, die acht Wochen nach neoadjuvanter Bestrahlung mit $<0,8$ Gray (Gy) entnommen wurden. Gemessen mittels RT-qPCR beobachteten sie eine signifikant gesteigerte Genexpression der angiogenese-assoziierten Faktoren VEGFR1, VEGFR2, Ang2, TGF- β 2 und FGF2. Filipa Marques et al. (135) führten ebenfalls *in vivo* Untersuchungen durch, nutzten jedoch Endothelzellen von Zebrafischlarven, die zwei Tage nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy entnommen wurden. Auch hier wurde mittels RT-qPCR eine signifikant gesteigerte Genexpression der angiogenese-assoziierten Faktoren VEGFR1, VEGFR2, Ang2, TGF- β 2 und FGF2 festgestellt.

Im Gegensatz dazu konnten Lee et al. (136) in ihren *in vivo* Untersuchungen in Folge der Anwendung von γ -Strahlung mit einer Dosis von 10 Gy Genexpressionsabnahmen der Angiogenese-assoziierten Faktoren VEGF, Ang1 und TEK beobachten. Ziel der Bestrahlung war Gewebe aus dem Gehirn von Ratten. Während die Genexpression des VEGF acht und 24 Stunden nach Bestrahlung signifikant vermindert war, waren Ang1 acht Stunden und TEK vier und acht Stunden nach Bestrahlung verringert exprimiert. Die Expression beider Faktoren näherte sich nach 24 Stunden wieder der Expression der Kontrollgruppe an. Die Forschenden konnten beobachten, dass das Ang2 vier, acht und 24 Stunden nach Bestrahlung signifikant vermehrt exprimiert war. Anhand der Detektion der Proteinexpression per doppelter Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Korrelation zwischen Genexpression und Proteinexpression der Faktoren festgestellt werden.

Ein weiterer Faktor, dessen Genexpressionsveränderung in Hinblick auf den Einfluss ionisierender Strahlung untersucht wurde, ist das VE-Cadherin. In seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül trägt es in großem Maße zur Permeabilität von Endothelzellen bei und ist essenziell für die Integrität der Endothelbarriere (137). Störungen dieser Integrität können schwerwiegende Folgen haben. So gilt unter anderem eine erhöhte Durchlässigkeit des Endothels für Makromoleküle als einer der zellulären Ausgangspunkte für atherosklerotischen Plaques (138). Gleichermäßen gilt diese erhöhte Durchlässigkeit als ein möglicher Faktor, der zur Invasivität von Krebszellen beitragen

und so eine tragende Rolle bei der Metastasierung von Tumoren nach erfolgter Strahlentherapie einnehmen könnte (139). Es konnte nachgewiesen werden, dass das VE-Cadherin ein Substrat und Ziel der Metalloproteinase *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10) ist, was zu einer Zunahme der endothelialen Permeabilität führt (140). Diesem Mechanismus liegt zugrunde, dass das ADAM10 das VE-Cadherin proteolytisch zersetzt. Dieser Zusammenhang hat das VE-Cadherin zu einem interessanten Target gemacht. So beobachteten Kabacik und Raj (139) sieben Tage nach Bestrahlung humaner Zellen der Koronararterie mit 0,5, 2 und 10 Gy eine dosisabhängige Zunahme des VE-Cadherins bei gleichzeitig vermindertem VE-Cadherin-Proteinspiegel. Beides korrelierte mit einer erhöhten endothelialen Permeabilität bei Störung der Zellverbindungen und bei erhöhter ADAM10 Aktivität. Ähnliche Beobachtungen konnten Kouam et al. (141) machen. Die Bestrahlung humaner Endothelzellen der Nabelvene mit 2 bis 4 Gy in einer Rate von 5 Gy/Minute (min) führte nach 12 und 24 Stunden zu einem verminderten VE-Cadherin-Proteinspiegel im endothelialen Zelllysat sowie einer bis auf das 1,2-fach gesteigerten mRNA-Expression des VE-Cadherins nach 24 Stunden. Als weitere Parallele zu Kabacik und Raj konnte eine Zunahme der endothelialen Permeabilität bei gesteigerter Expression und Aktivität des ADAM10 festgestellt werden. Des Weiteren konnten die Autoren nach Bestrahlung einer Brustkrebszelllinie bei Messung 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy per ELISA im Zellkulturüberstand eine 15%ige Zunahme des VEGF-A feststellen. Beide Untersuchungen kamen zu der Schlussfolgerung, dass die Abnahme der endothelialen Permeabilität in engem Zusammenhang mit dem Abbau des VE-Cadherins durch das ADAM10 stehen könnte.

Literaturdiskussion

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht ausgewählter Untersuchungen über Strahlenwirkung auf Angiogenese-assoziierte Faktoren

Autoren (Jahr)	Regulierte Faktoren	Versuchsaufbau	Bestrahltes Gewebe / Zelllinie	Dosierung	Zeitpunkt der Expressionsmessung nach Bestrahlung
Gil Marques et al. (2020)	VEGFR1, VEGFR2, Ang2, TGF- β 2, Von-Willebrand-Faktor, FGF2, HGF, PDGFC, IL8	<i>in vivo</i>	peritumorales Gewebe eines humanen rektalen Karzinoms	<0,8 Gy	8 Wochen
Filipa Marques et al. (2020)	VEGFR1, VEGFR2, Ang2, TGF- β 2, FGF2, <i>cystein-rich angiogenic inducer 61</i>	<i>in vivo</i>	Endothelzellen (Zebrafischlarven)	0,5 Gy	48 Stunden
Lee et al. (2011)	Ang1, Ang2, TEK, VEGF	<i>in vivo</i>	Gehirngewebe (Ratten)	10 Gy	4, 8, 24 Stunden
Kabacik und Raj (2017)	VE-Cadherin	<i>in vitro</i>	Zellen der Koronararterie (human)	0,5, 2, 10 Gy	7 Tage
Kouam et al. (2019)	VE-Cadherin	<i>in vitro</i>	Endothelzellen der Nabelvene (human)	2-4 Gy	12, 24 Stunden

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 3: Chemikalien und Kits

Chemikalien	Hersteller
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, Vereinigte Staaten von Amerika (USA)
PAGG-024Z RT ² Profiler™ PCR Array Chicken Angiogenesis	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
RNase-Free DNase Set (50)	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
RT ² First Strand Kit	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande

3.1.2 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Bebrüter, Brutmaschine Modell 3000 Typ D	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Ham-melburg, Deutschland
Homogenisierer, SpeedMill PLUS	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphoto-meter, NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Mikrozentrifuge, Haereus Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PCR-Thermocycler, CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Röntgenstrahler, D3000 Controller (X-Ray Equipment)	Gulmay Medical, Krefeld, Deutschland

Gerät	Hersteller
Thermocycler, PeqSTAR96x Universal	VWR Life Science, part of Avantor Inc., Radnor, Pennsylvania, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
ART Pipette Tips (Barrier and Non-Filtered Pipette Tips)	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Cyro.s™, PP, mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Innuspeed™ Lysis Tube E	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Kanüle 21G, BD Microlance™ 3	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Parafilm® M Verschlussfolie, PM-996	Bermis Company, Neenah, Wisconsin, USA
PCR Platten Hard-Shell clear well, white shell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
PCR-Klebefolien, Microseal `B` Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Petrischale	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Präzisionstücher, Kimtech Science	Kimberly-Clark® Professional, Dallas, USA
QIASHredder (250) Shreddersäulen	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
Spritze, BD Discardit™ II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Vliespflaster, Mircopore™	3M, Saint Paul, Minnesota, USA

3.1.4 Software

Tabelle 6: Software

Software	Hersteller
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
GeneGlobe Data Analysis Center (Webtool)	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
GraphPad PRISM 8.4.3	Graphpad Software, Inc., San Diego, California, USA
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA

3.1.5 Befruchtete Hühnereier

Die befruchteten Hühnereier wurden von der Firma LSL mit Sitz in Dieburg (Deutschland) geliefert.

3.2 Methoden

3.2.1 Durchführung des Chorion-Allantois-Membran Assays

Die Dauer einer Versuchsreihe des CAM-Assays belief sich auf je 14 Tage. Beim verwendeten Versuchsaufbau wurden die befruchteten Eier am dritten Tag der Inkubation fenestriert, ehe ab dem sechsten Inkubationstag fortlaufend pro Tag eine variable Anzahl an Gewebeproben aus der CAM herauspräpariert wurde. Abgeschlossen war der Versuch somit mit Ablauf des vierzehnten Inkubationstages. Das genaue Procedere ist im Folgenden im Detail beschrieben, eine Übersicht des Procederes liefert die Abbildung 5.

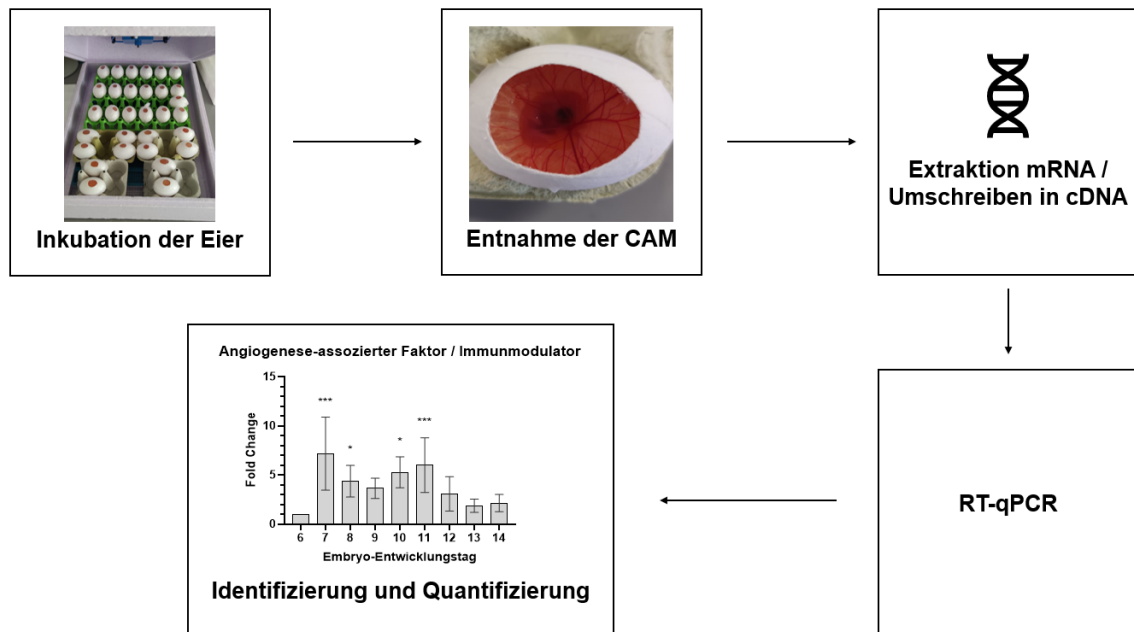


Abbildung 5: Exemplarischer Versuchsaufbau

Nach erfolgreicher Inkubation der Eier erfolgte die Entnahme einzelner Proben der CAM an den EDD 6 bis 14. Im Anschluss daran wurden die mRNA aus den Proben extrahiert, ehe diese in cDNA umgeschrieben wurde. Nach Durchführung der RT-qPCR erfolgte die statistische Auswertung durch relative Quantifizierung. Ziel war es, mögliche Expressionsprofile der untersuchten Angiogenese-assoziierten Faktoren und Immunmodulatoren auffindig zu machen.

3.2.1.1 Inkubation

Am Tag der Ankunft der Eier, welcher in der Regel auf einen Mittwoch fiel, wurden diese zunächst mit Hilfe von Tüchern und autoklaviertem Wasser gereinigt. Im Falle einer starken Beschädigung der äußeren Schale wurden die betroffenen Eier vorab aussortiert und entsorgt. Der Start der Inkubation erfolgte entweder am Tag der Lieferung, einem Mittwoch, oder dem darauffolgenden Freitag. In letzterem Fall wurden die Eier bis zum Beginn der Inkubation kühl gelagert. Vor Beginn erfolgte die Reinigung der Bebrüter und die Befüllung der Wasserrinnen mit autoklaviertem Wasser. Am Tag des Inkubationsbeginns wurden die Eier horizontal in den Bebrüter einsortiert. Sie inkubierten bei 37,5 Grad Celsius (°C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%.

3.2.1.2 Eröffnung der Eier

An EDD 3 wurde eine Fenestrierung aller Eier vorgenommen, um die CAM zugänglich zu machen. Es wurde jeweils immer nur ein Ei aus dem Bebrüter entnommen, sodass die Aufenthaltsdauer außerhalb des Bebrüters auf ein Minimum beschränkt wurde.

Für die Eröffnung eines Eis wurde zunächst mithilfe einer 10 Milliliter (ml) Spritze und einer 21G-Kanüle vorsichtig das stumpfe Ende des Eis perforiert. Daraufhin wurde die Kanüle langsam schräg nach unten bis zum Kontakt mit der Eierschale eingeführt. Je nach Größe des vorliegenden Eis wurden zwischen 5 bis 6 ml Eiweiß entnommen und in einem Becherglas entsorgt. Die Einstichstelle wurde mit einem Streifen Tesafilm sorgfältig verschlossen. Anschließend wurde zwecks Stabilisierung der Eischale ein Micropore Pflaster über die gesamte Breite des Eis geklebt. Zur Fenestrierung kam eine spitze Schere zum Einsatz. Zunächst wurde im hinteren Drittel mit der Scheren-

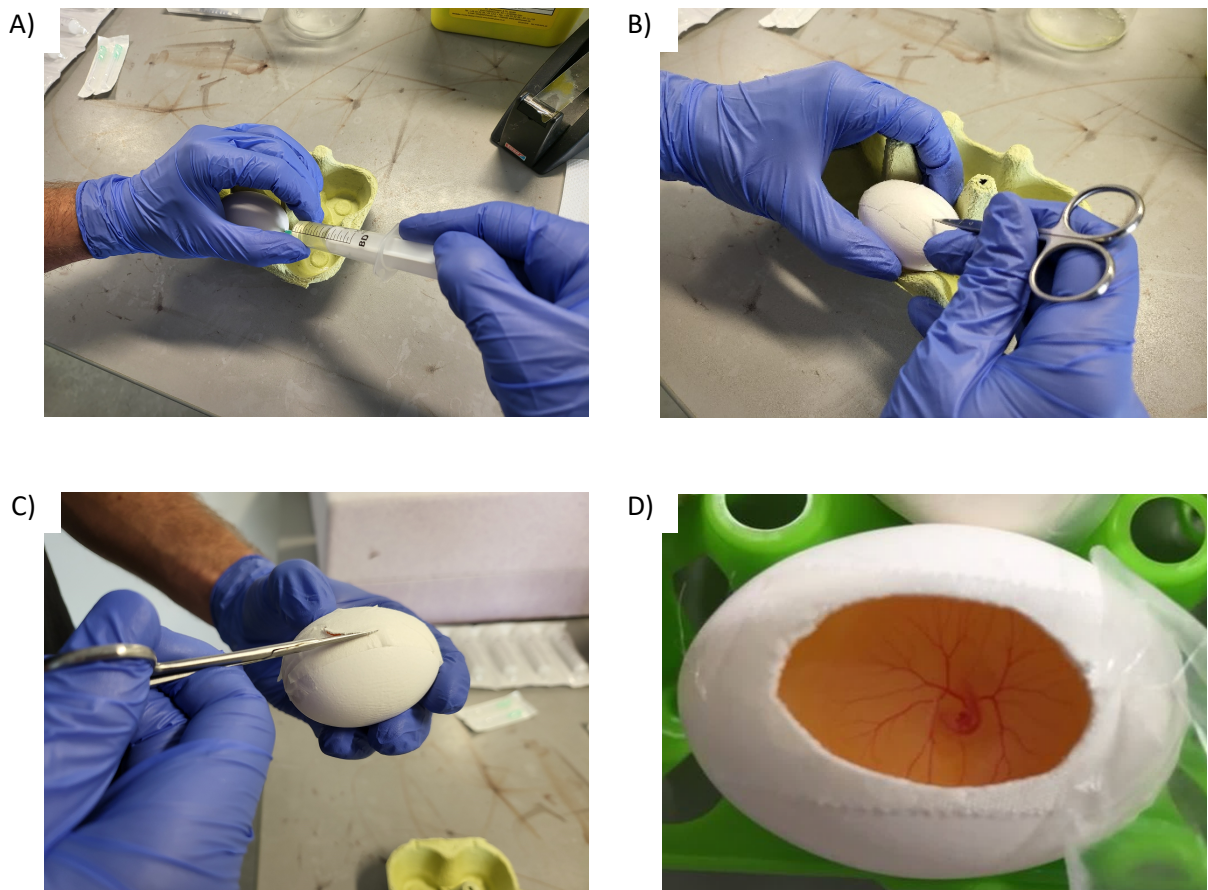


Abbildung 6: Schrittweise Eröffnung der Eier

Die Eröffnung der Eier fand an EDD 3 statt. Am stumpfen Ende des Eis wurden mit einer Kanüle 5 bis 6 ml Eiweiß entnommen (A). Daraufhin wurde das Ei mit einem Micropore Pflaster stabilisiert und mit einer Schere im hinteren Drittel des Eis eine Perforation geschaffen (B). Anschließend wurde ein ovales Fenster aus der Kalkschale und dem abgeklebten Bereich herausgeschnitten (C), ehe das Vorhandensein der Keimscheibe überprüft wurde (D).

spitze eine kleine Eingangsöffnung geschaffen. Ausgehend davon wurde ein kleines, ovales Fenster ausgeschnitten. Nach Eröffnung wurde das Vorhandensein des Keimblattes beurteilt. Sofern dies vorhanden war, also das Ei befruchtet war, wurde das Fenster mit einem Streifen Parafilm dicht verschlossen, um die Verdunstung zu minimieren, andernfalls wurde das Ei entsorgt.

3.2.1.3 Pflege der Bebrüter und Entnahme der Proben

Ab Eröffnung der Eier wurde jeden Tag die Vitalität der Eier beurteilt. Avitale Eier wurden unverzüglich entsorgt, um ein Verkeimen der Bebrüter zu verhindern. Ebenso wurde jeden Tag der Füllstand der Wasserrinnen geprüft und je nach Wasserspiegel erneut aufgefüllt.

Ab EDD 6 wurde mit der Entnahme von Gewebeproben aus der CAM begonnen. Dabei wurde, wie zuvor beschrieben, mit jedem Ei einzeln verfahren. Vorab wurden, passend auf die Stückzahl der zu entnehmenden Proben abgestimmt, Cyro-Gefäße beschriftet und deren Leergewicht dokumentiert. Zu Beginn der Entnahme wurde der Parafilm entfernt und zwei Microporepflaster an die Längsseite des waagrecht liegenden Eis angebracht. Mit einer spitzen Schere wurde zunächst das Fenster vergrößert. Anschließend wurde der Embryo über einen seitlich der CAM liegenden Zugangsweg im Ei enthauptet. Dann wurde die CAM mit einer Pinzette vorsichtig angehoben und, je nach Entwicklungstag, ein oder zwei Proben herauspräpariert. Die mögliche Probenanzahl war durch die Größe der CAM limitiert. Erst ab EDD 8 war es möglich, zwei Proben aus einer CAM zu gewinnen. Nach der Präparation wurden die Proben unmittelbar in die zuvor beschrifteten und dafür vorgesehenen Cryo-Gefäße überführt. Daraufhin folgte eine zweite Gewichtsbestimmung, in der ein Probenzielgewicht von 30 mg nicht überschritten werden durfte. Dafür wurde das zuvor ermittelte Leergewicht vom Gesamtgewicht der Probe mitsamt dem Gefäß subtrahiert. In dem Falle einer Gewichtsüberschreitung wurde nachträglich ein Teil der Probe mithilfe einer spitzen Schere entfernt. Nach abschließender Dokumentation des Gewichtes wurden die Proben unmittelbar in ein Behältnis mit Flüssigstickstoff (LN₂) überführt.

3.2.2 RNA-Isolation und photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Homogenisierung und Isolation der RNA erfolgte nach Herstelleranleitung des verwendeten *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN). Das verwendete Protokoll zur Extraktion tierischen Gewebes beinhaltete zwölf Schritte. Neben der Homogenisierung der Proben erfolgten Schritte zur Bindung und Reinigung der RNA sowie ihrer Elution. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Im Detail wurde wie folgt verfahren.

3.2.2.1 Homogenisierung der Proben

Die Schritte der Lyse und Homogenisierung erfolgten unmittelbar nach Entnahme der CAM. Die jeweilige Probe wurde mit einer sterilen Pinzette aus dem Cyro-Gefäß in ein für sie vorgesehenes Lyse Tube umgelagert. Es erfolgte die Zugabe des RNeasy Lysis Buffer (*RLT*) und eines *beta-mercapthoethanol* (β -*ME*) Gemisches, welches zuvor in einem Verhältnis von 100 Mikroliter (μ l) β -*ME* auf 10 ml *RLT* angesetzt wurde und daraufhin bis zum Verbrauch bei Raumtemperatur maximal einen Monat gelagert wurde. Die Menge des Gemisches variierte je nach entnommenen Probengewicht, bei Gewicht des Ausgangsmaterials <20 Milligramm (mg) wurden 350 μ l, bei \geq 20 mg 600 μ l pipettiert. Anschließend erfolgte der mechanische Aufschluss der Probe für 20 Sekunden (s) im *SpeedMill PLUS* Homogenisierer der Firma Analytik Jena. Dazu wurde das in dem Gerät vorgespeicherte Programm *Continuous mode* ausgewählt und die Zeit auf 20 s festgelegt. Danach wurde das Lysat auf die dafür vorgesehenen Shreddersäule pipettiert und 2 min bei 16.200 Relativer Zentrifugalkraft (x g) zentrifugiert, um unlösliche Verunreinigungen herauszufiltern und die Viskosität der Probe zu verringern. Im Anschluss wurde die Shreddersäule entnommen und das Gefäß mit dem Eluat wurde einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (3 min bei 21.100 x g), um etwaige Zellrückstände, die sich in Form eines Pellets absetzten, zu beseitigen. Nach Abpipettieren des Lysats mit gezieltem Verbleib eines kleinen Überrestes, um Verunreinigungen zu vermeiden, konnte entweder mit den Schritten der RNA-Isolation fortgefahren oder die Probe bei -80°C zwischengelagert werden.

3.2.2.2 RNA-Isolation

Sofern die Probe zwischengelagert wurde, musste diese bei Raumtemperatur auf Eis lagernd aufgetaut werden. Daraufhin folgten die Schritte zur Bindung der RNA an die RNA-Säule sowie das Waschen inklusive Hydrolyse etwaig vorhandener Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und die Elution. Zunächst wurde dieselbe Menge 70%igen Ethanols, wie die zuvor beigefügte Menge des *RLT-Buffer*/ β -*ME*-Gemisches, zum Lysat hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Maximal 700 μ l des entstandenen Gemisches wurden dann auf eine RNA-Säule (*RNeasy spin column*) pipettiert. Die Säule wurde bei 9.600 x g 15 s zentrifugiert, wodurch die Bindung der RNA an die Säule vollzogen wurde. Das Eluat wurde verworfen. Bei den Proben, bei denen die Ausgangsmenge mehr als 700 μ l betrug, wurde der Schritt mit dem im Ausgangsgefäß verbliebenen Lysat wiederholt.

Das Waschen der RNA sowie die Hydrolyse der DNA fanden in sechs Teilschritten statt. Zunächst wurden 350 µl des *RW 1 Buffer* auf die Säule pipettiert, diese dann 15 s bei 9.600 xg zentrifugiert und das angefallene Eluat verworfen. Anschließend wurde ein DNase-Gemisch nach dem folgenden Verhältnis angesetzt: 10 µl Desoxyribonuklease I (*DNase stock solution*) mit 70 µl *RDD-Buffer* je Probe. Dabei galt es zu beachten, das Enzym bereits zu Beginn des Procederes der RNA-Aufbereitung aus der Lagerung bei -20°C zu entnehmen und bei Raumtemperatur auf Eis auftauen zu lassen. 78 µl des DNase-Gemisches wurden dann auf die Säule pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur (zwischen 20°C-30°C) ruhen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurden erneut 350 µl des *RW1 Buffer* auf die Säule pipettiert und diese dann 15 s bei 9.600 x g zentrifugiert. Darauffolgend wurden 500 µl eines Wasch-Puffers (*RPE Buffer*) auf die Säule pipettiert, diese 15 s bei 9.600 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dieser Vorgang wurde mit veränderten Zentrifugationseinstellungen (2 min bei 16.200 x g) wiederholt. Daraufhin wurde die Säule auf ein neues *Collectiontube* überführt und 1 min bei 21.100 x g zentrifugiert.

Abschließend fand die Elution der RNA statt. Im Zuge dessen wurden die Säulen vorsichtig aus den Tubes entnommen. Während dieses Schrittes galt es zu beachten, dass die Säulen nicht in Kontakt mit etwaig verbliebenen Flüssigkeitsresten an den Gefäßwänden der Tubes kamen, um Verunreinigungen mit Ethanol zu vermeiden. Die Säulen wurden nach vorsichtiger Entnahme in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Weiterhin wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen pipettiert, ehe diese 1 min bei 9.600 x g zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Säulen verworfen. Darauffolgend wurde der Gehalt der RNA jeder Probe bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.2.2), und die Probe bis zur weiterführenden cDNA-Synthese bei -80°C gelagert.

3.2.2.3 Messung des RNA-Gehalts mittels Photometrie

Die photometrische Konzentrationsmessung der RNA erfolgt durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm), was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Zur Messung der RNA wurde das Mikrovolumen-UV/VIS Spektralphotometer *NanoDrop™* verwendet. Laut Herstellerinformationen wird die exakte Berechnung der Konzentration durch folgende Formel vorgenommen:

$$c = A * f$$

c = Analytkonzentration in ng/µl A

A = Extinktion in Extinktionseinheiten (A)

f = Faktor in ng-cm/µl, (hier: bei RNA: 40 ng-cm/µl)

Vor Beginn der Messung wurde der Messplatz gereinigt. Nachfolgend wurde auf der Benutzeroberfläche des Gerätes zunächst der Punkt „Nukleinsäuren“ und anschließend der Unterpunkt „RNA“ ausgewählt. Zunächst wurden 1,5 µl RNase-freies Wasser auf die Messvorrichtung pipettiert und eine Leerwertmessung vorgenommen. Durch das Aktivieren der Auto-Funktion des Gerätes wurde jede Messung mit dem Absenken des Gerätearmes automatisch gestartet. Anschließend erfolgte die Reinigung der Messvorrichtung mit Präzisionstüchern, ehe 1,5 µl der zu messenden Probe aufgetragen und die Messung gestartet wurde. Dieser Schritt wurde zwischen den jeweiligen Messungen der Proben wiederholt. Abschließend wurden die Messergebnisse abgespeichert und fotodokumentiert. Für jede Probe wurden neben der Nukleinsäurekonzentration die Reinheitsverhältnisse A260/280 und A260/A230 bestimmt. Während das A260/280-Verhältnis ein Indikator für Proteinverunreinigungen darstellt und sich für die verwendeten Proben in einem Bereich von 2,0 – 2,2 befinden sollte, gibt das A260/230-Verhältnis Verunreinigungen an, welche bei 230 nm absorbieren, z. B. Phenole. Auch der Richtwert für letzteren Indikator lag bei 2,0 – 2,2. Proben, die genannten Kriterien nicht entsprachen, wurden aus den Folgeversuchen ausgeschlossen.

3.2.3 cDNA-Synthesierung

Um eine RT-qPCR mit dem gewonnenen Probenmaterial durchführen zu können, musste die isolierte RNA zunächst via Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die Synthesierung der cDNA erfolgte mithilfe des *iScript™ cDNA Synthesis Kits* (Bio-Rad Laboratories).

Die Menge der für die Synthesierung eingesetzten RNA pro Probe wurde auf 1.500 ng in 15 µl Nuklease-freiem Wasser definiert. Dazu wurde das dem Kit beiliegende Wasser verwendet. Es folgte die Berechnung des Mischverhältnisses der zu verwendenden RNA und des RNase-freien Wassers unter Verwendung der Formel:

$$\text{benötigte RNA } [\mu\text{l}] = \frac{1}{\text{RNA Konzentration nach Photometrie } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} \times \text{einzusetzende RNA } [\text{ng}]$$

$$\text{benötigte Menge RNase-freies H}_2\text{O } (\mu\text{l}) = 15 \mu\text{l} - \text{benötigte RNA } (\mu\text{l})$$

In einem ersten Schritt wurden die verwendeten Proben sowie der *5 x iScript Reaction Mix* auf Eis lagernd aufgetaut. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach dem Beschriften der benötigten cDNA-Tubes wurde für jede Probe zunächst individuell die berechnete Menge des RNase-freien Wassers und anschließend die RNA in das jeweilige Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend erfolgte das Ansetzen eines Mastermix nach Herstellerangaben, bestehend aus 4 µl *5x iScript Reaction Mix* und 1 µl *iScript Reverse Transcriptase* pro Probe, zudem wurde mit 2 Proben mehr gerechnet, um einen Überschuss zu erzeugen. Es galt zu beachten, dass die Reverse Transkriptase erst unmittelbar vor der Verwendung aus der -20°C Lagerung zu entnehmen war, um das empfindliche Enzym zu schützen. Nach dem Pipettieren der vorgesehenen 5 µl des Mastermix in jedes cDNA-Tube wurden die Reaktionsgefäße unmittelbar in den *PeqSTAR96x Universal Thermocycler (VWR Life Science)* umgelagert und mit der cDNA-Synthese via Reverser Transkription in der dafür vorgesehenen Funktion begonnen. Das Temperaturprotokoll der Reversen Transkription ist Tabelle 7 zu entnehmen. Nach Abschluss des Vorgangs erfolgte die Entnahme der Proben. Sie wurden jeweils mit 100 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Unter der Annahme, dass die gesamte RNA-Menge komplett und korrekt in cDNA umgeschrieben wurde, entsprach die Konzentration der cDNA 125 µg/ml. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Nutzung bei -20°C eingefroren. An dieser Stelle erscheint es im Nachgang sinnvoll, die Proben so zu aliquotieren, dass für die RT-qPCR nur jeweils ein Aliquot aufgetaut werden muss, um ständige Temperaturwechsel zu vermeiden und eine gleichbleibende Qualität der Proben zu gewährleisten. Dies war in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt.

Tabelle 7: Protokoll der Reversen Transkription

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	40	/
2	25	5
3	46	20
4	95	1
5	4	bis Entnahme

3.2.4 *Real-time* quantitative Polymerasekettenreaktion

3.2.4.1 Allgemeines

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient als Methode zur Amplifikation eines definierten Teils eines doppelsträngigen DNA-Strangs, dessen Sequenz vorab bekannt ist. Um eine Quantifizierung der zu untersuchenden Gene in Echtzeit vorzunehmen, wurde die RT-qPCR eingeführt. Die Quantifizierung wird durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes und Fluoreszenzmessung ermöglicht. Dies gelingt durch Einlagerung des Farbstoffes in die doppelsträngige DNA. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nach jedem durchlaufenen Zyklus, sodass die Messwerte in einer Amplifikationskurve dargestellt werden können. Eine sich an die Amplifikation des PCR-Produktes anschließende Schmelzkurvenanalyse ermöglicht zudem eine Spezifitätsbestimmung der amplifizierten DNA-Sequenz.

3.2.4.2 Design und Bestellung der Primer

Die für die RT-qPCR verwendeten Primer sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Die Primer des HIF-1 α , des MMP13 sowie der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) konnten aus vorhandener Literatur gewonnen werden. Die Primer für das NOS2, das TGF- β und das VEGF-A wurden eigens designet und getestet. Dazu wurden die Gene in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), spezifisch für das *Gallus Gallus domesticus* herausgesucht. Auch die NCBI-Referenznummern sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Darauffolgend wurden die Primer mithilfe des Tools *Primer-BLAST* der NCBI designet. Die Bestellung der Primer erfolgte über die Website *euofinsgenomics.eu*. Unter dem Reiter *RUO Products* wurde im Unterpunkt *Application Oligos* der weiterführende Link *PCR Primer* ausgewählt. Darauffolgend wurde der Reiter *PCR Primer Tubes* angewählt. Auf der sich darauf öffnenden Seite erfolgte die Auswahl des Punktes *Single Input* sowie die Angabe der gewünschten Anzahl der zu bestellenden Primer unter *Number of PCR Primers*. Nach dem Anklicken des Reiters *Next* wurden der gewünschte Name des Primers sowie die DNA-Sequenz von 5' in 3'-Richtung angegeben, ehe das Produkt unter *Add to cart* dem Warenkorb hinzugefügt wurde.

Nach Lieferung der Primer wurden diese unter Nutzung von RNase-freiem Wasser ausgehend von einer Konzentration von 100 pmol/ μ l auf 20 pmol/ μ l verdünnt und anschließend bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Verwendete Primer

Primer	NCBI Reference Sequence des Gens	Sense	Antisense	Quelle (Jahr) (wenn vor- handen)
HIF-1 α	NM_204297.1	CCAGCAGTTCCTCAT- GCAAT	AAATGCTGCTAGCCCTT- CCC	Deng et al. (2020)
MMP13	NM_001293090.1	TTTGGGCTATGAAT- GGCTAT	TAGTATGCAGGATGCG- GACA	Huh et al. (2012)
NOS2	NM_204961.1	GGCATGATGAGACCCG- TAGG	GCCCAATAGCCACCTT- CAGT	Generiert mit Primer-Blast (NCBI)
TGF- β	NM_001318456,1	CACCGACTACTACTGCTT- CGGC	GTCGGCGCTCCAGATG- TAC	Generiert mit Primer-Blast (NCBI)
VEGF- A	NM_205042.2	AGAAAGGCCGG- TACAAACCA	GCAAGTGCCTCGTT- TAACT	Generiert mit Primer-Blast (NCBI)
HPRT1	AJ132697	GCACTATGACTCTAC- CGACTATTG	CAGTTCTGGGTTGAT- GAGGTT	Nascimento et al. (2015)

3.2.4.3 Durchführung der RT-qPCR

Es wurde zunächst ein Mastermix unter Verwendung des *iQ™ SYBR® Green Supermixs (Bio-Rad Laboratories)* angefertigt. Dieser enthielt neben dem Farbstoff *SYBR® Green I* die für die PCR benötigten Nukleosidtriphosphate, die DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid sowie Enhancer und Stabilisatoren. Das Mischverhältnis zur Herstellung des Mastermix ist Tabelle 9 zu entnehmen. Die für die RT-qPCR verwendeten Primer sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 9: Mischverhältnis des Mastermix pro well

Mischverhältnis des Mastermix pro well

iSYBR	11 μ l
Primer sense	1 μ l
Primer antisense	1 μ l
RNase-freies Wasser	5 μ l

Zunächst wurde die benötigte Gesamtmenge der einzelnen Reagenzien des Mastermixes berechnet. Dazu wurde die Anzahl der zu untersuchenden Proben mit der Anzahl der pro Probe belegten Wells multipliziert. Daraus resultierte die Anzahl der Wells,

für die Mastermix benötigt wurde. Um einen Überschuss zu produzieren, wurden zusätzlich vier Wells addiert. Als letzter Schritt wurde der zuvor errechnete Wert (Anzahl der Gesamtwells) mit der benötigten Menge jedes Reagenz aus der Tabelle 9 multipliziert.

Anschließend wurden alle verwendeten cDNA-Proben auf Eis liegend bei Raumtemperatur aufgetaut. Alle weiteren Schritte zur Vorbereitung der RT-qPCR wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Für jedes Primerpaar wurde ein Eppendorfgefäß mit 2 ml Fassungsvermögen beschriftet. Anschließend wurden nacheinander die berechneten Gesamtmengen des RNase-freien Wassers sowie des Primers (*sense* und *antisense*) in das Tube pipettiert. Als letzter Schritt wurde das SYBR® Green I aus dem Kühlschrank genommen und unmittelbar in die bestehenden Gemische pipettiert.

Die RT-qPCR wurde mit dem *CFX Connect (Bio-Rad)* Thermocycler und den dazugehörigen 96-well-Platten durchgeführt. Die Durchführung erfolgte unter einer dafür vorgesehenen Werkbank, bei der zuvor eine Dekontamination mit Ultraviolettstrahlung durchgeführt wurde. Je nach Belegung der Platte wurde in jedes zu füllende Well 18 µl des Mastermix vorgelegt, ehe 2 µl der zu untersuchenden cDNA-Probe folgten, was zurückgerechnet auf die ursprünglich eingesetzte Menge RNA ungefähr 15 ng entspricht. In der dafür vorgesehenen Software, dem *Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad Laboratories)*, wurden vorab das zu durchlaufende Protokoll sowie die Belegung der Platten definiert. Das verwendete Temperaturprotokoll ist Tabelle 10 zu entnehmen. Nach erfolgtem Pipettieren der Platte wurde diese mit Klebefolien verschlossen, bei Raumtemperatur und 1.000 x g 1 min zentrifugiert, um Blasen in den Vertiefungen zu vermeiden und alle Lösungen gleichmäßig unten auf dem Boden der Platte zu vereinen, dann in den Thermocycler eingelegt und der Durchlauf gestartet.

Tabelle 10: Protokoll der RT-qPCR

Schritt	Phase	Wiederholungen	Temperatur(°C)	Zeit (min:s)
1	Initiale Denaturierung	1x	95	3:00
2	Denaturierung	39x	95	0:10
3	Annealing		58	0:30
4	Elongation		72	0:20
5	Schmelzkurvenanalyse	1x	65 – 95 + 0,5	je 0:05

3.2.4.4 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient zur Überprüfung der Spezifität des entstandenen PCR-Produktes. Dazu wird anschließend an die Amplifikation eine stufenweise Erhitzung durchgeführt, welche zur Denaturierung der DNA führt. Da der Fluoreszenzfarbstoff, wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben, eine Bindung mit der DNA eingeht, wird er bei Dissoziation in Einzelstränge wieder freigesetzt, wodurch eine Abnahme der gemessenen Fluoreszenz zu beobachten ist. Diese Abnahme ist in einem sigmoidalen Kurvenverlauf dargestellt. Am Wendepunkt der Kurve ist diejenige Temperatur erreicht, an der die DNA zur Hälfte dissoziiert ist. Ist diese Temperatur bei allen Proben, bei denen derselbe Primer verwendet wurde, gleich, ist davon auszugehen, dass nur ein PCR-Produkt vervielfältigt wurde.

Die Schmelzkurvenanalyse wurde mit dem *Bio-Rad CFX Manager* ausgewertet. Dazu wurde unter dem Reiter *Melt Curve* die grafische Visualisierung der Schmelzkurve aufgerufen. Zur Beurteilung, ob lediglich ein PCR-Produkt vervielfältigt wurde, wurde das Diagramm, bei dem die negative erste Regression gegen die Temperatur aufgetragen wird, zur Hilfe genommen. Schmelzkurven, die mehrere Maxima aufwiesen oder keines aufweisen konnten, wurden aus den anschließenden Auswertungen ausgenommen. Ebenso wurde mit Schmelzkurven verfahren, deren Schmelztemperatur nicht derjenigen Schmelztemperatur entsprach, die spezifisch für den jeweiligen Primer zu erwarten war.

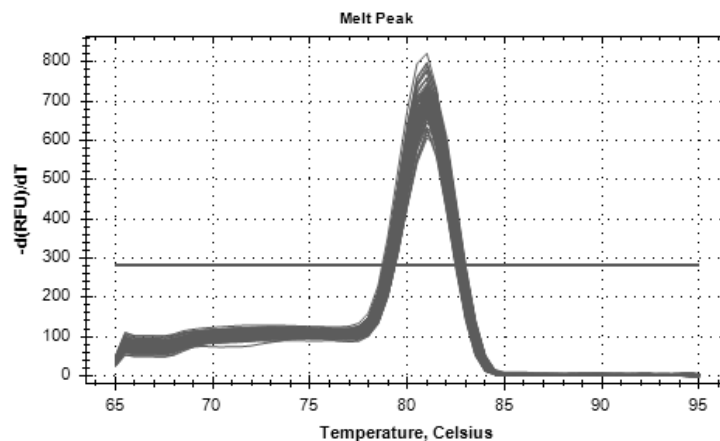


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Schmelzkurven bei Amplifikation eines einzigen PCR-Produktes

Zu sehen ist die grafische Darstellung der negativen ersten Regression gegen die Temperatur ($-d(\text{Relatives Fluoreszenzniveau})/\text{Temperatur}$). In dieser beispielhaften Darstellung liegen die Maxima aller Proben bei exakt 81°C, sodass eine Vervielfältigung eines einzigen PCR-Produktes anzunehmen ist.

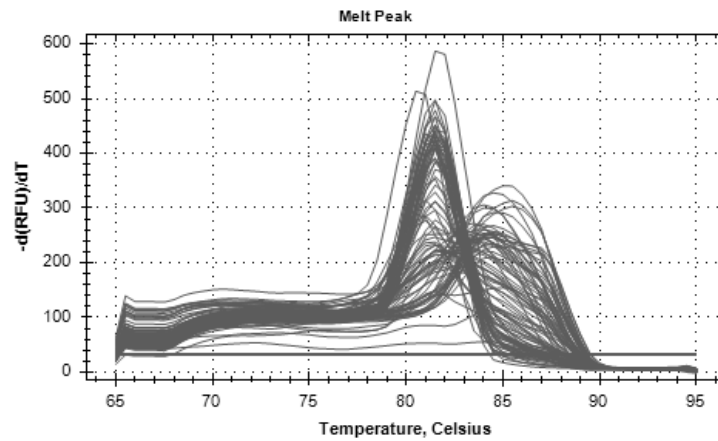


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Schmelzkurven bei Amplifikation mehrerer PCR-Produkte

Zu sehen ist die grafische Darstellung der negativen ersten Regression gegen die Temperatur ($-d(\text{Relatives Fluoreszenzniveau})/\text{Temperatur}$). Die Maxima der einzelnen Proben variieren zwischen 67°C und $85,5^{\circ}\text{C}$, es ist eine Vervielfältigung diverser PCR-Produkte anzunehmen.

3.2.5 Bestrahlung der nativen CAM

Um den Einfluss einer exemplarischen Behandlungsmethode auf die Expression pro- und antiangiogener Gene in der nativen CAM zu untersuchen, wurde die Methodik in einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit nochmal erweitert. Als gängige Behandlungsmethode, von der bekannt ist, dass sie relevant in die Angiogenese eingreift, wurde die Radiatio gewählt (142). Die Methodik wurde zusätzlich zum Hinzufügen der Behandlung dahingehend verändert, dass die Genexpression nun mithilfe von RT² qPCR Profiler Arrays der Firma Qiagen® untersucht wurde. Um einen protokollgetreuen Workflow zu ermöglichen, wurde auch die cDNA-Synthetisierung in diesem Abschnitt der Arbeit mit dem von Qiagen® empfohlenen RT² First Strand Kit durchgeführt.

3.2.5.1 Vorbereitung

Das Prinzip der Inkubation blieb grundsätzlich unverändert. Änderungen der Methodik waren an den EDD 10,12 und 14 zu verzeichnen. An diesen Tagen wurde an zehn Eiern, die nach gewohntem Procedere an EDD 3 eröffnet wurden, die Fenestrierung erweitert und wieder mit Parafilm abgedeckt. Davon waren fünf Eier für die Behandlung vorgesehen, die restlichen fünf Eier dienten als Kontrollgruppe. Nach Erweiterung der Fenestrierung wurden die Eier der Behandlungs- und Kontrollgruppe aus dem Bebrüter genommen und in die Radiologie gebracht, in der ab 9 Uhr die Radiatio an den fünf Eiern der Behandlungsgruppe, wie in 3.2.5.2 beschrieben, durchgeführt wurde.

3.2.5.2 Bestrahlung der nativen CAM

Die Radiatio der nativen CAM erfolgte mithilfe des Röntgenstrahlers *D3000 Controller* der Firma *Gulmay Medical*. Die Dosierung der Strahlentherapie wurde auf 8 Gy festgelegt. Zur exakten Positionierung des Röntgenstrahlers auf der nativen CAM wurde eine 2 Zentimeter (cm) Rundtubus verwendet. Dieser wurde vorsichtig auf den Parafilm aufgesetzt, sodass nach Abschluss der Behandlung ein Abdruck des Tubus auf dem Parafilm verblieb, der mit einem permanenten Foliestift nachgezeichnet wurde. Dadurch konnte eine exakte Entnahme der CAM im Bestrahlungsfeld gewährleistet werden.

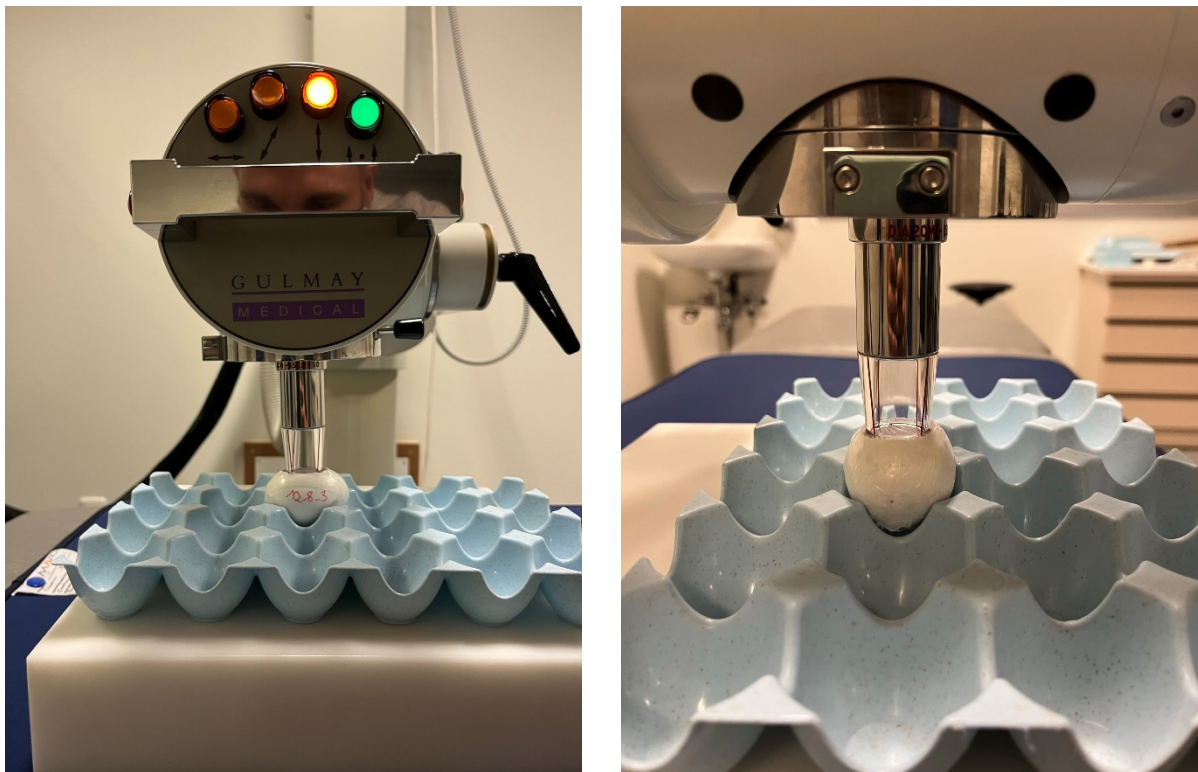


Abbildung 9: Bestrahlung der nativen CAM

Nach Transport in die Radiologie wurden die Eier nacheinander mit 8 Gy bestrahlt. Dazu wurde der Röntgenstrahler D3000 Controller der Firma Gulmay Medical verwendet. Ein 2 cm Tubus wurde auf den Parafilm aufgelegt, danach wurde die Umrandung des Tubus mit einem Foliestift nachgezeichnet, um den Bereich des Bestrahlungsfeldes zu markieren.

3.2.5.3 Probenentnahme

Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Eier erneut für 6 Stunden inkubiert, ehe pro Ei jeweils zwei Proben nach gewohntem Procedere, siehe Abschnitt 3.2.1.3, aus jeweils einem Ei entnommen wurden. Unmittelbar nach Entnahme wurde nach obig beschriebenen Protokoll mit der Extraktion der RNA und der darauffolgenden photometrischen

RNA-Konzentrationsbestimmung mit Bestimmung der Reinheitswerte fortgefahren, siehe Abschnitt 3.2.2.

3.2.5.4 cDNA-Synthetisierung

In die Untersuchungen wurden nur Proben eingeschlossen, die den vom Hersteller geforderten Kriterien zur Qualitätssicherung entsprachen. Die in der photometrischen Konzentrationsbestimmung ermittelten Werte sollten folgenden Normen entsprechen: Der A260/230 Reinheitswert sollte größer 1,7 sein, der A260/280 Reinheitswert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen und die bei A260 bestimmte RNA-Konzentration sollte größer 40 µg/ml betragen.

Die cDNA-Synthese mit dem First Strand Kit lief in zwei separaten Schritten ab. Zunächst erfolgte die Inkubation der Proben mit einem genomischen DNA-Eliminierungsgemisch, ehe eine nachfolgende Inkubation mit einem Reverse-Transkriptionsgemisch durchgeführt wurde. Für beide Schritte mussten zunächst Berechnungen angestellt werden. Die Berechnung des *genomic DNA elimination mix* erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{benötigte RNA } [\mu\text{L}] = \frac{1}{\text{RNA Konzentration nach Photometrie } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right]} \times 500 \text{ ng}$$

$$\text{benötigte Menge RNase freies H}_2\text{O } (\mu\text{L}) = 8 \mu\text{L} - \text{RNA } (\mu\text{L})$$

Der *reverse transcription mix* wurde wie folgt berechnet:

Tabelle 11: Komponenten zum Ansatz des *reverse transcription mix* zur Synthetisierung der cDNA für die RT² Profiler qPCR Arrays

Komponente	Volumen für eine Reaktion * x-Proben
5 x Buffer BC3	4 µl * x
Control P2	1 µl * x
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl * x
RNase-freies Wasser	3 µl * x
Gesamtvolumen	10 µl * x

Das Volumen einer Reaktion wurde mit der Anzahl der umzuschreibenden Proben (plus zwei weiteren Proben Überschuss) multipliziert.

Nachdem die Reagenzien des Kits auf Eis liegend aufgetaut wurden, wurden diese für 10-15 s zentrifugiert, um den Inhalt der Gefäße auf den Boden zu bringen. Anschließend wurde die errechnete Menge RNA sowie 2 µl des *Buffer GE* und die errechnete Menge des RNase-freien Wassers in ein zuvor beschriftetes cDNA-Tube pipettiert. Daraufhin erfolgte die erste Inkubation für 5 min bei 42°C. Direkt im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben bis zum weiteren Fortfahren für mindestens 1 min auf Eis gelagert.

Bereits während der Inkubation des genomischen DNA-Eliminationsgemisches wurde die Reverse-Transkriptionsmischung nach obiger Berechnung pipettiert. Anschließend an die Lagerung auf Eis wurde jedes cDNA-Reaktionsgefäß mit Probe mit 10 µl des Gemisches versetzt und durch ein vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend erfolgte der zweite Teil der Inkubation. Zunächst wurden die Proben bei 42°C für 15 min inkubiert, ehe eine Inkubation von 5 min bei 92°C folgte. Nach Abschluss der Reaktion wurden 91 µl RNase-freies Wasser zu jedem Reaktionsgefäß hinzugefügt. Unter der Annahme, dass die gesamte RNA-Menge komplett und korrekt in cDNA umgeschrieben wurde, entsprach die Konzentration der cDNA 45 µg/ml. Bis zur Durchführung der RT-qPCR wurden die Proben anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.5.5 Durchführung der RT² Profiler qPCR Arrays

Die Genexpressionsanalyse der mit Radiatio behandelten Proben und der jeweilig dazugehörigen Kontrollgruppe wurde mit RT² Profiler qPCR Arrays der Firma Qiagen® durchgeführt, die speziell auf die Untersuchung von Angiogenese-assoziierten Faktoren von Hühnern ausgelegt sind. Bei diesen Arrays handelt es sich um bereits vorbelegte Platten, die neben 84 Primerpaaren der zu untersuchenden Gene fünf Primerpaare für verschiedene Haushaltsgene (HKG) sowie ein Primerpaar einer positiven PCR-Kontrolle (PPC), ein Primerpaar einer reverse Transkription-Kontrolle (RTC) und ein Primerpaar einer Kontrolle zur Überprüfung auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA (GDC) enthalten. Das Layout der Platte ist der Abbildung 10 zu entnehmen, die genaue Auflistung der vom Hersteller verwendeten Primer befindet sich im Anhang, siehe Tabelle 25.

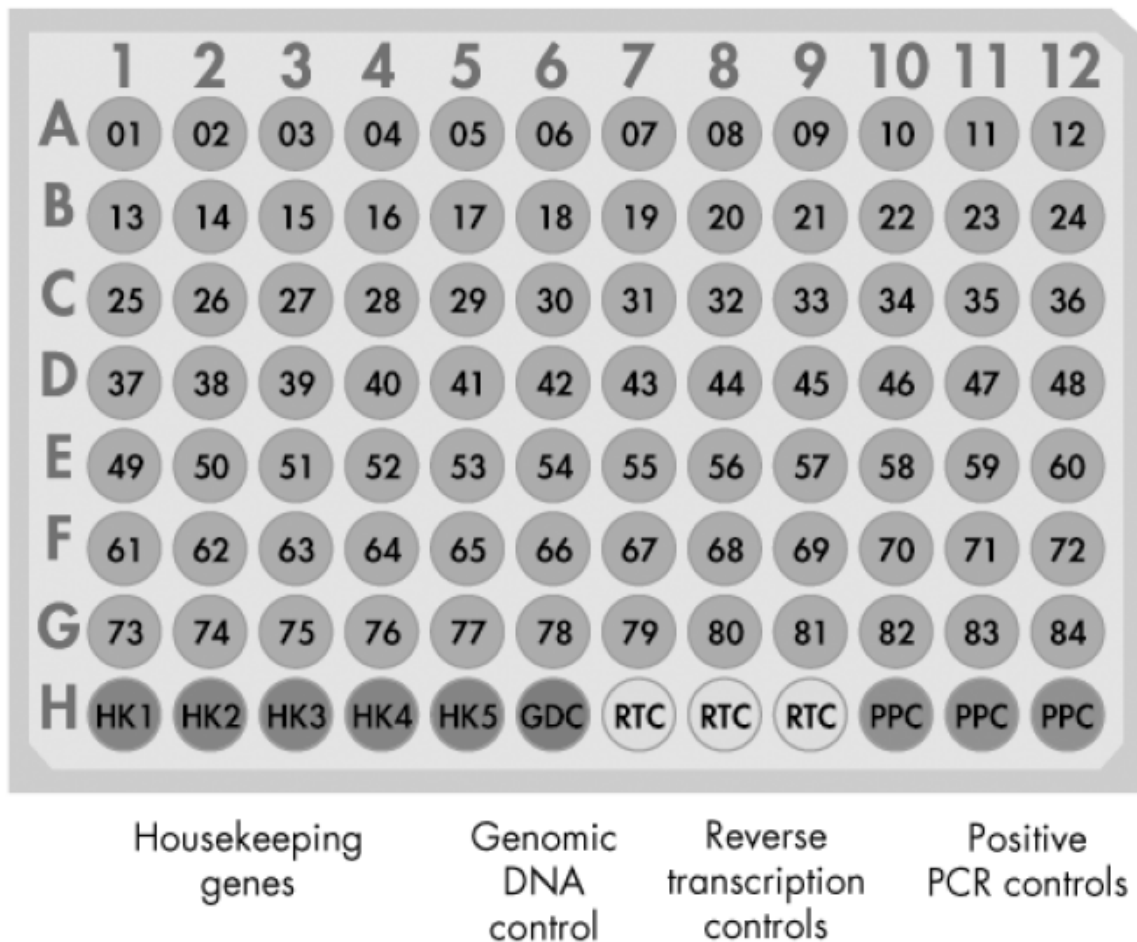


Abbildung 10: Layout des RT² Profiler qPCR Arrays

Dem Array liegt eine 96-well-Platte zugrunde. In den Vertiefungen A1-G84 sind 84 Primerpaare von 84 Genen vorhanden. In den Vertiefungen H1-5 befinden sich die Primerpaare für die fünf HKGs, H6 ist für das Primerpaar der GDC vorgesehen. H7-9 beinhalten die Primerpaare der RTC, H10-12 sind für die Primerpaare der PPC vorgesehen.

Vorbereitend wurde die PCR-Werkbank 30 min mit UV-Licht bestrahlt, um etwaig vorhandene DNA zu inaktivieren. Parallel dazu wurde die zu untersuchende Probe bei Raumtemperatur auf Eis lagernd aufgetaut. Ebenso wurde der dazugehörige *RT² SYBR® Green Mastermix* für 10 s bei Raumtemperatur und 10.000 U zentrifugiert, um den Inhalt auf den Boden des Gefäßes zu bringen. Anschließend wurden in einem 5 ml Eppendorfgefäß die Komponenten, die für die PCR benötigt wurden, nach dem Schema pipettiert, welches aus Tabelle 12 zu entnehmen ist.

Tabelle 12: Pipettierschema der PCR-Komponenten des RT² Profiler qPCR Arrays

Komponente	Volumen
2x RT² SYBR® Green Mastermix	1.350 µl
cDNA	102 µl
RNase-freies Wasser	1.248 µl
Gesamtvolumen	2700 µl

Anschließend wurden unter der PCR-Werkbank jeweils 25 µl des vorgefertigten Gemisches in die Vertiefungen der Platte pipettiert, die Platte mit den dazugehörigen Verschlusskappen abgedichtet und bei Raumtemperatur 1 min bei 1.000 x g zentrifugiert, ehe die RT-qPCR nach dem Protokoll, welches der Tabelle 13 zu entnehmen ist, gestartet wurde.

Tabelle 13: RT- qPCR Temperatur-Protokoll des RT² Profiler qPCR Arrays

Schritt	Phase	Wiederholungen	Temperatur(°C)	Zeit (min:s)
1	Initiale Denaturierung	1x	95	10:00
2	Denaturierung	39x	95	0:15
3	Annealing & Elongation		60	0:60
5	Schmelzkurvenanalyse	1x	65 – 95 + 0,5	je 0:05

3.2.6 Statistische Auswertung

3.2.6.1 Relative Quantifizierung

Zur relativen Quantifizierung der RT-qPCR wurden zunächst die Rohdaten aus der Software *CFX Manager* von Bio-Rad, welche für den verwendeten Thermocycler zur Verfügung steht, entnommen. Um die Auswertung vornehmen zu können, findet der *ct-Wert* (in der Software *cq-Wert*) Verwendung. Dieser Wert entspricht der Anzahl an Zyklen, die benötigt wurden, um ein vorgegebenes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Er entspricht in der grafischen Darstellung der Amplifikation dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit einer definierten Schwellenwertlinie. Zusätzlich zur Schwellenwertlinie, dem *Threshold*, ist die Berechnung des *ct*-Wertes abhängig von der *Baseline*. Diese dient dazu, die Hintergrundfluoreszenz der RT-qPCR in deren initialen Zyklen zu erfassen. Davon ausgehend wird diese Hintergrundfluoreszenz bei jeder Fluor-

reszenzmessung nach Vollendung eines Zyklus von der Fluoreszenz subtrahiert, so dass sie der Korrektur dient. Beide Faktoren, der *Threshold* und die *Baseline*, sind veränderbar und beeinflussen so den resultierenden *ct-Wert*. Dementsprechend wurden zunächst, vor dem Exportieren der Rohdaten, für jede RT-qPCR beide Werte betrachtet und angepasst. Unter dem Reiter *Settings* wurde der Unterpunkt *Baseline Threshold* gewählt. Die *Baseline*, also die Hintergrundfluoreszenz, wird in den initialen Zyklen der RT-qPCR gemessen. Diese Zyklen wurden mithilfe der Funktion *Auto Calculated* berechnet und blieben dementsprechend unverändert. Der *Threshold* hingegen wurde für jede einzelne RT-qPCR nachjustiert. Dies geschah unter dem Punkt *Single Threshold User defined*. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Wert oberhalb des Hintergrundsignals aber noch im unteren Drittel bis zur Hälfte der linearen Phase des Amplifikationsdiagramms lag und bei allen durchgeführten RT-qPCRs gleich definiert war, um diese direkt vergleichbar zu machen.

Nachdem die Faktoren nachjustiert waren, wurden die *ct-Werte* in das Programm *Excel* von Microsoft® überführt, um die relative Quantifizierung vorzunehmen. Diese wurde mit der sogenannten $\Delta\Delta CT$ -Methode durchgeführt. Dazu erfolgt in einem ersten Schritt eine Normalisierung. Dabei wird die Expression des *gene of interest* (GOI) auf die Expression eines HKG bezogen $\Delta CT_{GOI} = CT_{GOI} - CT_{HKG}$. Bei diesem HKG handelt es sich um ein Gen, das unter den zu untersuchenden Versuchsbedingungen, die bei Versuchsaufbau gegeben sind, weitestgehend konstant exprimiert wird. Dafür wurden verschiedene Gene getestet und die Spannweite der *ct-Werte* bestimmt. Es wurde eine möglichst kleine Spannweite angestrebt. So strebt der Hersteller Qiagen® beispielsweise eine Spannweite von 1,5 Zyklen über alle Proben hinweg gesehen an. Die Wahl des Haushaltgens fiel auf die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1). Daran anschließend fand die Errechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) zwischen der normalisierten Expression des GOI und der normalisierten und gemittelten Expression einer Kontrollgruppe statt $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{GOI} - \Delta CT_{Mittelwert\ Kontrolle}$. Als Kontrollgruppe diente in diesem Versuchsaufbau die Genexpression am ersten Tag der Probenentnahme, der EDD 6. Die letztendliche mittlere relative Expression, auch *Fold Change* genannt, errechnete sich mithilfe der Formel $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. Beide Begriffe werden in den folgenden Abschnitten synonym verwendet. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der $2^{(-\Delta ct)}$ -Wert der einzelnen Proben des jeweiligen EDD herangezogen. Dieser Wert entsteht aus der Subtraktion

des ct-Wertes der jeweiligen Probe mit dem ct-Wert des HKG, ein Bezug zur Kontrollgruppe ist darin nicht vorhanden. Er wurde für jeden EDD gemittelt. Im Anschluss erfolgte ein one-way ANOVA, bei dem jeder Mittelwert der einzelnen EDD mit dem Mittelwert des EDD 6 verglichen wurde. Daraufhin erfolgte die Korrektur mit dem Bonferroni-Test für multiple Mittelwertvergleiche.

3.2.6.2 Auswertung der RT² Profiler qPCR Arrays

Die RT² Profiler qPCR Arrays wurden mithilfe des von Qiagen® zur Verfügung gestellten Webportals *GeneGlobe Data Analysis Center* ausgewertet. Dazu wurden zunächst die Rohdaten der PCRs, nach manueller Nachjustierung der Basislinie und des Schwellenwerts wie in *Relative Quantifizierung* beschrieben, in eine dafür vorgesehene Excel-Tabelle überführt, welche als Vorlage zum Download zur Verfügung stand. Im Anschluss daran konnten die Rohdaten auf dem Webportal eingepflegt und die Analyse mit der *RT² Profiler PCR Data Analysis* gestartet werden.

3.2.6.2.1 Einpflegen der Daten

Das Hochladen des vorherig erstellten Datensatzes war unter dem Reiter *Upload/Select* möglich. In diesem Schritt wurde spezifiziert, welcher Array durchgeführt wurde und zur Auswertung eingepflegt werden sollte. Im Unterpunkt *Product Type* wurde die Option *Cataloged Array* ausgewählt. Anschließend wurde unter *Species* der Punkt *Chicken (PAGG)* gewählt, danach unter *Catalog #* die genaue Bezeichnung des Arrays *PAGG-024Z RT² Profiler™ PCR Array Chicken Angiogenesis*. Im nächsten Schritt wurde unter *Plate Format* das *96-well*-Format ausgewählt, ehe unter *Upload File* die zuvor erstellte Excel Datei im *.XLSX*-Format hochgeladen wurde. Anschließend wurden die Daten mit *Submit* eingepflegt.

3.2.6.2.2 Einrichten der Analysevoraussetzungen

Nach Einpflegen der Daten hatte der Benutzer die Möglichkeit, diese weiter zu spezifizieren. Dies geschah unter dem Reiter *Setup*. In dem Unterpunkt *Sample Manager* bestand die Möglichkeit, verschiedene Proben jeweils einer Kontrollgruppe oder einer jeweiligen Testgruppe zuzuordnen. Nach der Wahl eines Ct-Ausschlusswertes, der auf ≥ 35 definiert wurde, wurden die nun präzisierten Werte erneut mit *Submit* gespeichert. Daraufhin wurden dem Nutzer in dem *Unterpunkt Data QC* verschiedene Parameter zur Qualitätsanalyse angezeigt. Der erste Wert war die PCR Array Reproduzierbarkeit, welche die technische Variabilität der einzelnen Vertiefungen repräsentiert. Dazu wurden die Werte der drei auf den jeweiligen Platten liegenden PPCs verwendet. Diese

sollten plattenintern bei einem Ct-Wert von 20 ± 2 liegen und zwischen den Platten der zu vergleichenden Gruppen eine Spannweite von zwei nicht überschreiten. Der zweite Wert war die RT-Effizienz, also die Effizienz der reversen Transkription. Dieser Parameter wurde nach der Formel $\Delta Ct = \emptyset RTC - \emptyset PPC$ berechnet und sollte ≤ 5 sein. Der dritte Kontrollparameter war die GDC, welche einen Hinweis auf Verunreinigungen mit genomischer DNA lieferte. Wenn auf der jeweiligen Platte der ct-Wert der GDC einen definierten Schwellenwert unterschreitet, ist davon auszugehen, dass es in der Durchführung des Arrays oder der Synthetisierung der cDNA zu einer Kontamination mit genomischer DNA gekommen ist. Dieser Schwellenwert wurde von Qiagen® im beiliegenden Handbuch *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5*, wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, wie folgt festgelegt.

Tabelle 14: Interpretation des GDC-Wertes für das RT² Profiler qPCR Array

GDC Ct-Wert Interpretation

< 30	Die genomische DNA hat wahrscheinlich einen detektierbaren Einfluss auf alle Gene des Arrays.
30-33	Es ist wahrscheinlich, dass die genomische DNA einen detektierbaren Einfluss hat.
> 33	Die genomische DNA hat wahrscheinlich keinen detektierbaren Einfluss auf das Array, und falls doch, hat dieser wahrscheinlich keinen Einfluss auf den <i>Fold Change</i> .

Im Falle, dass eine Probe einen der Kontrollparameter verfehlte, wurde dies dem Nutzer mit der Ausgabe „*Inquiry*“ signalisiert. Im nächsten Schritt wurden im Unterpunkt *Normalization* die für die fortführenden Analysen und Berechnungen nötigen HKG ausgesucht. Dazu wurde unter *Normalization Method* die Funktion *Automatic Selection from HKG Panel* genutzt. Diese Funktion wählte aus den fünf vorpipettierten HKG diejenigen heraus, die über alle Proben hinweg gesehen die geringsten Schwankungen der Roh-Ct Werte aufwiesen. Diese Schwankungen sollten laut Hersteller nicht $\geq 1,5$ sein. Im Anschluss daran wurde die getroffene Auswahl erneut mit *Submit* bestätigt.

3.2.6.2.3 Analyse

Unter dem Reiter *Analysis* fand die eigentliche Analyse mithilfe des Webtools statt. Hierfür standen zwei verschiedene Unterpunkte zur Verfügung.

Unter dem ersten Unterpunkt *Results* bestand die Möglichkeit, sich die errechneten Ergebnisse als Rohwerte anzuschauen. Dazu gehören die errechnete *Fold Regulation*, der errechnete *Fold Change*, der *Average ΔCt* und der errechnete $2^{(-\Delta ct)}$ -Wert. Die zweite zur Ansicht zur Verfügung stehende Tabelle war die Darstellung des *Fold Change*, welche an dieser Stelle zunächst erläutert werden soll. Dieser wurde von Qiagen® wie folgt berechnet: Zunächst wurde für die jeweilige Probe der ΔCT -Wert berechnet ($\Delta CT = CT (Gene\ of\ Interest) - CT (Housekeeping\ or\ Reference\ Gen)$) oder $\Delta CT = CT (Gene\ of\ Interest) - Average\ CT (Housekeeping\ or\ Reference\ Gen)$, wenn zuvor mehrere HKG gewählt wurden. Anschließend wurden die ΔCT -Werte einer Gruppe gemittelt ($Average\ \Delta CT = \frac{\Delta CT (Sample\ 1) + \Delta CT (Sample\ 2) + \dots + \Delta CT (Sample\ n)}{n\ Samples}$). Als nächster Schritt wurde der gemittelte ΔCT -Wert der Testgruppe von dem gemittelten ΔCT -Wert der Kontrollgruppe subtrahiert ($\Delta \Delta CT = Average\ \Delta CT (Test\ group) - Average\ \Delta CT (Control\ group)$). In einem letzten Schritt wurde der *Fold Change* errechnet ($Fold\ Change = 2^{(-\Delta \Delta CT)}$). Neben dem *Fold Change* wurde in der dargelegten Tabelle der p-Wert zur Festlegung der statistischen Signifikanz dargestellt. Dabei wurde ein t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung vorgenommen. Zur Berechnung wurden die $2^{-\Delta CT}$ -Werte jeder Probe aus der jeweiligen Test- bzw. Kontrollgruppe verwendet. In einer weiteren Spalte *Comments* wurden Bemerkungen in Form der Buchstaben A, B und C dargestellt. Die Erläuterungen zu den jeweiligen Bemerkungen sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Bemerkungen in der Darstellung der Rohdaten im GeneGlobe Data Analysis Center (QIAGEN®) und deren Bedeutung

Bemerkung	Erläuterung
A	In einer der Gruppen (Kontroll- oder Testgruppe) ist die relative Expression des Gens gering, d.h. der CT-Wert liegt bei > 30 in der einen und bei < 30 in der anderen Gruppe.
B	In beiden Gruppen ist die relative Expression des Gens gering, d.h. der ct-Wert liegt bei > 30. Zudem ist der p-Wert hoch oder nicht verfügbar.
C	Das dargestellte Gen kann in keiner Probe nachgewiesen werden (kein CT-Wert vorhanden oder > des Cut-Off-Wertes).

Die erste zur Verfügung stehende Tabelle war die Darstellung der Rohwerte der *Fold Regulation*. Diese war eine abgewandelte Darlegung des *Fold Change* und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Fold Change} \geq 1: \text{Fold Regulation} = \text{Fold Change}$$

$$\text{Fold Change} < 1: \text{Fold Regulation} = \left(-\frac{1}{X}\right)$$

Die Darstellung des negativen Kehrwertes sollte die Interpretation der Daten bei Verminderung der Genexpression, also Werten, bei denen der *Fold Change* <1 ist, vereinfachen.

Die nächsten zwei zur Verfügung stehenden Tabellen waren einerseits die Darstellung der gemittelten ΔCT -Werte als Rohwerte (Tabellenname *Average ΔCT*) sowie andererseits die Darstellung der $2^{(-\Delta\text{CT})}$ - Werte (Tabellenname $2^{-\Delta\text{CT}}$).

Unter dem zweiten Unterpunkt *Plots & Charts* bestand die Möglichkeit, sich die zuvor errechneten Daten auf verschiedene Art und Weise grafisch visualisieren zu lassen. Neben einem Streudiagramm, einem *Vulcano Plot*, einem *clustergram* und einer *heat map* bestand die Möglichkeit, individuelle Linien- und Balkendiagramme zu erstellen. Um jedoch etwaige Änderungen in der Darstellung der Ergebnisse vereinfacht durchführen zu können, wurden die Daten aus den zur Verfügung stehenden Tabellen exportiert und eigene Diagramme mithilfe des Programmes *GraphPad Prism* genutzt. Die genaue Erläuterung, welche Diagramme zur Auswertung der durchgeführten Arrays ausgewählt wurden, ist dem Abschnitt 3.2.7.2 zu entnehmen.

3.2.7 Grafische Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen wurden mithilfe des Programmes *GraphPad Prism* der Firma *GraphPad Software* visualisiert.

3.2.7.1 Darstellung der mittleren relativen Expression (*Fold Change*) der GOI

Die zuvor errechnete mittlere relative Expression des jeweiligen GOI wurde mithilfe von *GraphPad Prism* dargestellt. Dazu wurde eine Spaltentabelle erstellt, in der jede Spalte einen individuellen EDD des Versuchsaufbaus abbildete. Anschließend wurden in jede Zeile der jeweiligen Spalte die aus Excel errechneten Werte der mittleren relativen Expression eingefügt. Lediglich an EDD 6 entfiel das Procedere, da dieser Tag als Kontrollgruppe fungierte und in der Darstellung mit dem Wert eins definiert wurde.

Um statistische Ausreißer aufzufinden und aus den Auswertungen auszuschließen, wurde die Funktion *Identify Outliniers* verwendet. Als Methode der Ausreißeranalyse wurde die *ROUT* Methode mit dem Parameter „höchstwahrscheinliche Ausreißer zu identifizieren“ gewählt. Als Ausreißer identifizierte Werte wurden daraufhin aus der Auswertung herausgenommen. Im Anschluss daran wurde die Tabelle in ein Säulendiagramm überführt, welches den Mittelwert der mittleren relativen Expression sowie die Standardabweichung für den jeweiligen Tag auf der y-Achse abbildet, auf der x-Achse sind die jeweiligen EDD dargestellt. Die jeweiligen Werte wurden mithilfe von *Graphpad Prism* ermittelt.

3.2.7.2 Darstellung der Ergebnisse der RT² Profiler qPCR Arrays

Wie bereits in Abschnitt 3.2.6.2.3 erwähnt, wurden die Ergebnisse der RT² Profiler qPCR Arrays mithilfe des *Gene Globe Data Analysis Centers* ausgewertet. Für die Darstellung dieser Ergebnisse wurde, wie auch für die Ergebnisse der Hauptversuchsreihe, *GraphPad Prism* genutzt. Dafür wurden die zuvor errechnete mittlere relative Expression (*Fold Change*) sowie der p-Wert verwendet. Die Darstellung erfolgte mithilfe sogenannter *Vulcano Plots*. Diese zeigen die Genexpressionsveränderungen einzelner Gene in Relation zur statistischen Signifikanz dieser Veränderungen. Dies ist dadurch möglich, dass auf der x-Achse die mittlere relative Expression logarithmiert zur Basis 2 und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des p-Werts aufgetragen wird. Die *Vulcano Plots* ermöglichen den Vergleich einer Testgruppe mit einer Kontrollgruppe. Drei vertikale Linien im Diagramm signalisieren die Veränderung der *Fold Regulation*, die beiden äußeren Linien markieren den Grenzbereich, der zuvor auf den Wert zwei definiert wurde. Dabei entspricht eine *Fold Regulation* von zwei einem *Fold Change* von zwei und somit einer Veränderung der Genexpression um das 2-fache. Gene, deren *Fold Regulation* rechts der rechten vertikalen Linie liegt, sind also um das mindestens 2-fache vermehrt exprimiert. Eine *Fold Regulation* von minus zwei entspricht ferner einem *Fold Change* von 0,5 und somit einer Verminderung der Genexpression um das 2-fache. Dementsprechend sind Gene, deren *Fold Regulation* links der linken vertikalen Linie liegt, um das mindestens 2-fache vermindert exprimiert. Eine horizontale Linie ist als Grenzmarkierung zum Signalisieren der statistischen Signifikanz vorhanden. Dabei erreichen Werte oberhalb dieser horizontalen Linie das zuvor ausgewählte Signifikanzniveau ($p < 0,05$), Werte unterhalb erreichen dies nicht. Zwecks Anfertigung der *Vulcano Plots* wurde in *Graphpad Prism* eine Spaltentabelle erstellt, in der eine Spalte die errechnete mittlere relative Expression und die andere

Spalte den errechneten p-Wert abbildet. Jede Zeile war einem Gen des Arrays zugeordnet. Um die mittlere relative Expression und die p-Werte zu logarithmieren, wurde die Funktion *Transform* verwendet.

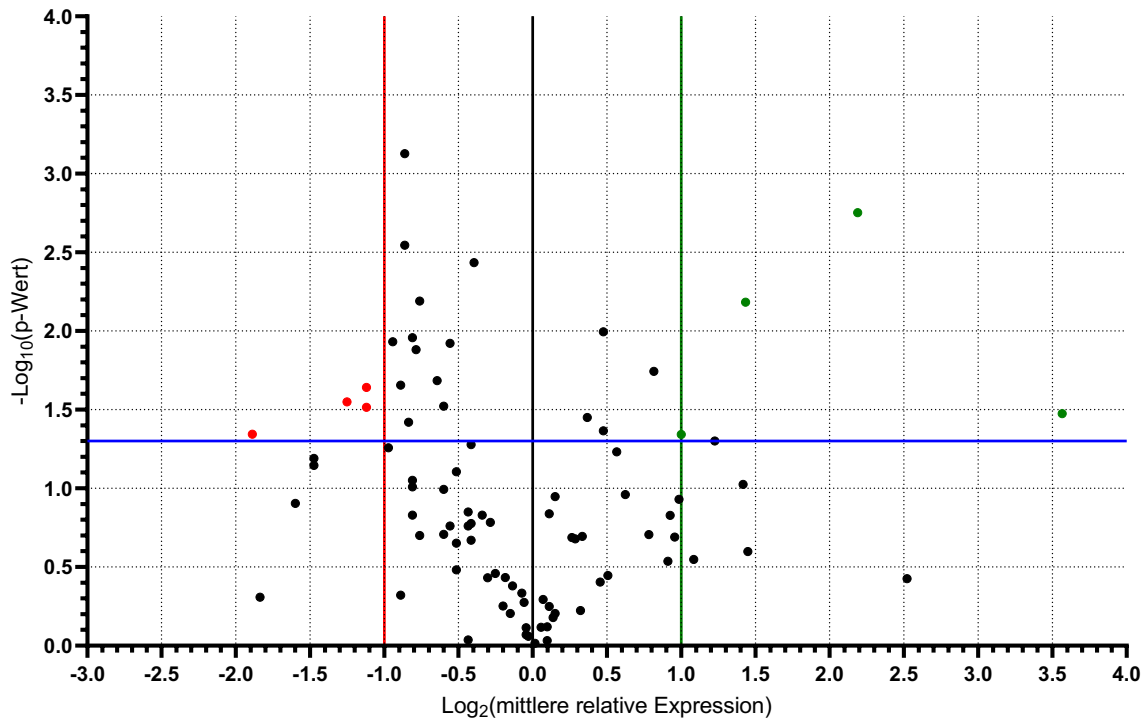


Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung eines *Vulcano Plots*

Der *Vulcano Plot* dient der übersichtlichen Darstellung der veränderten Genexpression einer Testgruppe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Während auf der x-Achse die mittlere relative Expression logarithmiert zur Basis 2 dargestellt ist, wird auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des p-Werts aufgetragen. Die jeweiligen Punkte bilden ein Gen ab. Zur anschaulichen Darstellung, inwiefern sich die jeweilige Expression eines Genes verändert hat, sind drei vertikale Linien vorhanden. Die mittige Linie bei $x = 0$ (hier schwarz) dient als Basislinie. Alle Punkte, die auf dieser Linie liegen, zeigen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderte Expression der Testgruppe an. Alle Punkte links der schwarzen Linie zeigen eine verminderte, alle Punkte rechts der schwarzen Linie eine vermehrte Expression der Gene an. Die hier zur Veranschaulichung rot dargestellte vertikale Linie bei $x = -1,0$ symbolisiert eine verminderte Expression um das 2-fache, also eine mittlere relative Expressionsveränderung (Fold Change) von 0,5 bzw. eine Fold Regulation von -2. Die hier zur Veranschaulichung grün dargestellte vertikale Linie bei $x = 1,0$ symbolisiert eine vermehrte Expression um das 2-fache, also eine mittlere relative Expressionsveränderung (Fold Change) von 2, gleichermaßen einer Fold Regulation von 2. Die blau dargestellte horizontale Linie bei $y = 1,3$ symbolisiert einen p-Wert von 0,05 und zeigt damit die statistische Signifikanz an. Alle Punkte oberhalb der Linie erreichen das Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Somit erreichen alle Punkte, die hier in diesem beispielhaften Diagramm in Rot dargestellt sind, das Signifikanzniveau bei gleichzeitiger mittlerer relativer Expressionsveränderung um das 2-fache. Punkte, die eine grüne Färbung haben, sind signifikant um das mindestens 2-fache vermehrt exprimiert.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse in zwei verschiedenen Abschnitten erläutert. Im ersten Abschnitt wird die mittlere relative Expression der Gene VEGF-A, MMP13, HIF1 α , NOS2 sowie TGF- β in der nativen CAM innerhalb des Beobachtungszeitraums von EDD 7 bis 14 dargestellt. Der zweite Abschnitt befasst sich mit den Ergebnissen der Durchführung der RT² Profiler qPCR Arrays nach erfolgter Bestrahlung der CAM an den EDD 10, 12 und 14.

4.1 Genexpressionsanalyse der Hauptversuchsreihe

Für insgesamt fünf Gene wurde die jeweilige mittlere relative Expression in der CAM an den EDD 7 bis 14 im Vergleich zur Expression an EDD 6 als Referenzgruppe mittels RT-qPCR und relativer Quantifizierung bestimmt. Nach Errechnung der mittleren relativen Expression der einzelnen Proben wurden für den jeweiligen EDD der geometrische Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) der mittleren relativen Expression bestimmt. Zur statistischen Untersuchung wurde der $2^{(-\Delta ct)}$ -Wert der einzelnen Proben des jeweiligen EDD herangezogen. Dieser wurde für jeden EDD gemittelt. Im Anschluss erfolgte ein one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, bei dem jeder Mittelwert der einzelnen EDD mit dem Mittelwert des EDD 6 verglichen wurde. In die Analyse wurden Proben aus Eiern von jeweils drei unabhängigen Durchläufen einbezogen. Dabei belief sich die Gesamtprobenzahl der untersuchten Eier auf $N(\text{Eier}) = 73$. Die Anzahl der Proben, die schlussendlich nach erfolgter Schmelzkurvenanalyse und Auswertung nicht verwertbarer Proben ausgewertet werden konnten, variiert für die jeweiligen Gene. Als nicht verwendbare Probe galten diejenigen Proben, die als Ausreißer errechnet wurden, in der RT-qPCR den CT-Cutoff ≥ 35 überschritten oder in der Schmelzkurvenanalyse ausschieden. Bei den Durchläufen wurde an verschiedenen Tagen mit der Inkubation begonnen. Bei dem ersten Durchlauf mit $N(\text{Eier}) = 9$ startete die Inkubation an einem Freitag. Bei dem zweiten Durchlauf mit $N(\text{Eier}) = 37$ wurde die Inkubation sowohl an einem Mittwoch als auch an einem Freitag begonnen. Bei dem dritten Durchlauf mit $N(\text{Eier}) = 27$ startete die Inkubation an einem Mittwoch.

4.1.1 Vascular endothelial growth factor-A

Von EDD 7 bis 11 zeigte sich eine gesteigerte mittlere relative Expression des VEGF-A in der CAM im Vergleich zu EDD 6. Diese nahm anschließend von EDD 12 bis 14 wieder ab. Dabei war im Vergleich zu EDD 6 an EDD 7 und 11 die mittlere relative Expression des VEGF-A hoch signifikant gesteigert ($p < 0,001$) und an EDD 8 und 10 signifikant erhöht ($p < 0,05$). Das Maximum der VEGF-A Expression wurde an EDD 7 mit einer mittleren relativen Expression von $7,18 \pm 3,7$ erreicht und an EDD 11 lag die mittlere relative Expression mit $6,02 \pm 2,79$ nur knapp darunter. An EDD 13 und 14 betrug die mittlere relative Expression hingegen nur noch $1,89 \pm 0,68$ (EDD 13) und $2,15 \pm 0,87$ (EDD 14) und war damit nur noch in etwa doppelt so hoch wie die mittlere relative Expression an EDD 6.

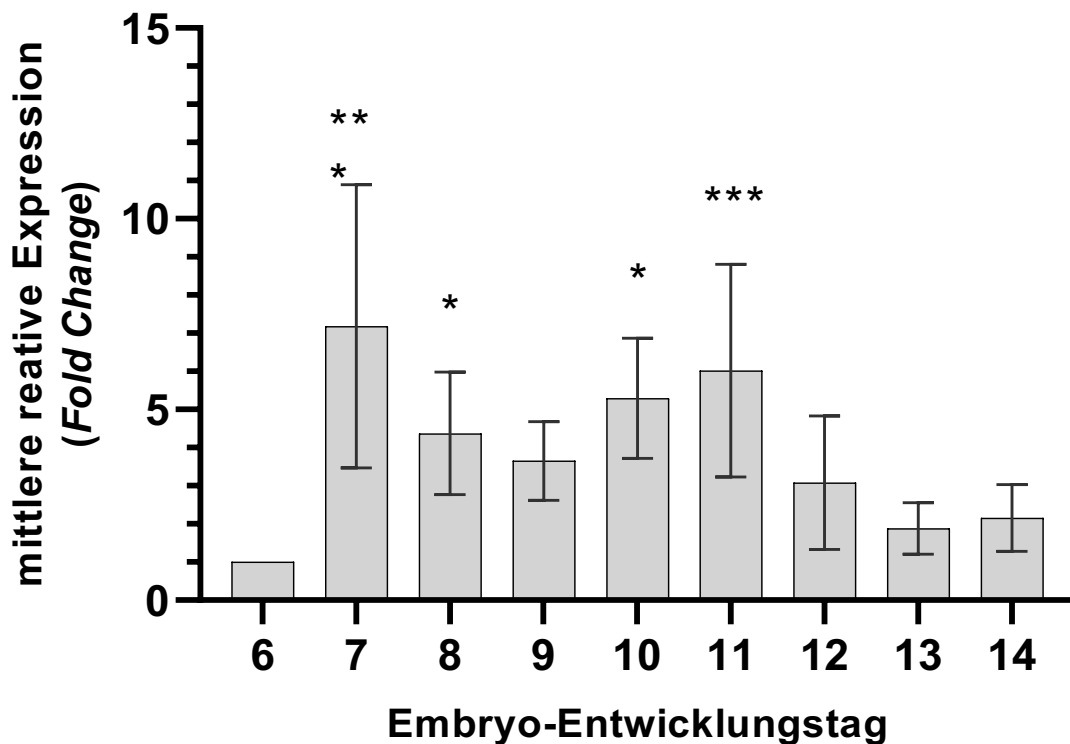


Abbildung 12: mittlere relative Expression (*Fold Change*) des VEGF-A

Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren relativen Genexpression (y-Achse) von VEGF-A in der CAM an EDD 7 bis 14 (x-Achse) im Vergleich zur Expression an EDD 6 als Kontrollgruppe aus drei unabhängigen Durchgängen. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA durchgeführt, um jeden EDD mit EDD 6 als Kontrollgruppe zu vergleichen, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, Korrektur mit dem Bonferroni-Test für multiple Mittelwertvergleiche. Die mittlere relative Expression stieg zu EDD 7 hin bis auf das 7-fache an, blieb bis zu EDD auf einem hohen Niveau und sank von EDD 12-14 wieder. Sie war an EDD 7 und 11 hoch signifikant und an EDD 8 und 10 signifikant erhöht im Vergleich zu

EDD 6. Die zur Analyse herangezogene Probenzahl belief sich auf N=71 mit einem Minimum von N(Eier)≥5 pro Tag.

4.1.2 Matrix-Metalloproteinase 13

Bei der Auswertung der CT-Werte der MMP13 Genexpression zeigte sich, dass an EDD 6 nur eine einzige Probe mit 34,91 marginal unterhalb des CT-Cutoffs lag. Alle anderen Proben fielen aus der Auswertung heraus. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass an EDD 6 noch keine Expression des MMP13 in der CAM vorlag. Ausweichend wurde der EDD 7 als erster Tag, an dem das MMP13 messbar exprimiert wurde, gewertet und als Kontrollgruppe gewählt.

In den ersten drei EDD blieb die mittlere relative Expression von MMP13 in der CAM auf einem konstant niedrigen Niveau, ehe sie sich zu EDD 10 hin signifikant auf einen Wert von $8,25 \pm 3,47$ steigerte ($p < 0,01$). Von dort aus stieg sie über EDD 11 mit einer mittleren relativen Expression von $10,37 \pm 4,19$ kontinuierlich auf ein Maximum an EDD 12 von $11,56 \pm 6,4$. An beiden Tagen ließ sich eine signifikant erhöhte mittlere relative Expression feststellen ($p \leq 0,001$). Ausgehend davon sank die MMP13 Expression in der CAM zu EDD 13 und 14 wieder auf ein mittleres Niveau ab.

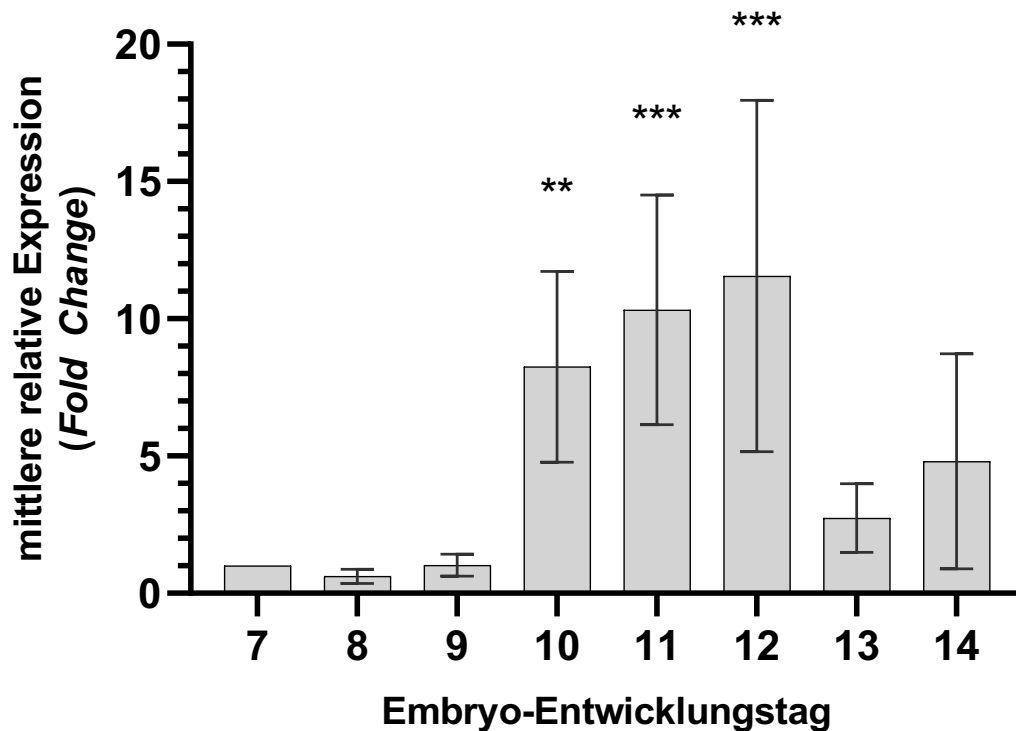


Abbildung 13: mittlere relative Expression (Fold Change) des MMP-13

Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren relativen Genexpression (y-Achse) von MMP13 in der CAM an EDD 8-14 (x-Achse) im Vergleich zur Expression an EDD 7 als Kontrollgruppe aus drei unabhängigen Durchgängen. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA durchgeführt, um jeden EDD mit EDD 7 als Kontrollgruppe zu vergleichen, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, Korrektur mit dem Bonferroni-Test für multiple Mittelwertvergleiche. Die mittlere relative Expression von MMP13 in der CAM blieb von EDD 7 bis 9 auf einem niedrigen Niveau, ehe sie sich zu EDD 10 hin ungefähr verachtachte. Sie stieg bis zu EDD 12 kontinuierlich, zu EDD 13 hin fiel sie dann auf ein mittleres Niveau ab. Die zur Analyse herangezogene Probenanzahl belief sich auf $N=60$ mit einem Minimum von $N(\text{Proben}) \geq 5$ pro Tag.

4.1.3 Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha

Mit einer mittleren relativen Expression von $1,89 \pm 0,34$ war die Expression des HIF-1 α an EDD 7 im Vergleich zu EDD 6 ungefähr verdoppelt ($p < 0,05$) und erreichte hier ihr Maximum. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die mittlere relative Expression mit dem eben benannten Maximum und einem Minimum von $0,79 \pm 0,29$ an EDD 14 eine, im Vergleich zu Genen wie dem VEGF-A oder dem MMP13, geringe Schwankungsbreite aufwies. Von EDD 7 bis 14 war eine Abnahme der mittleren relativen Expression zu beobachten.

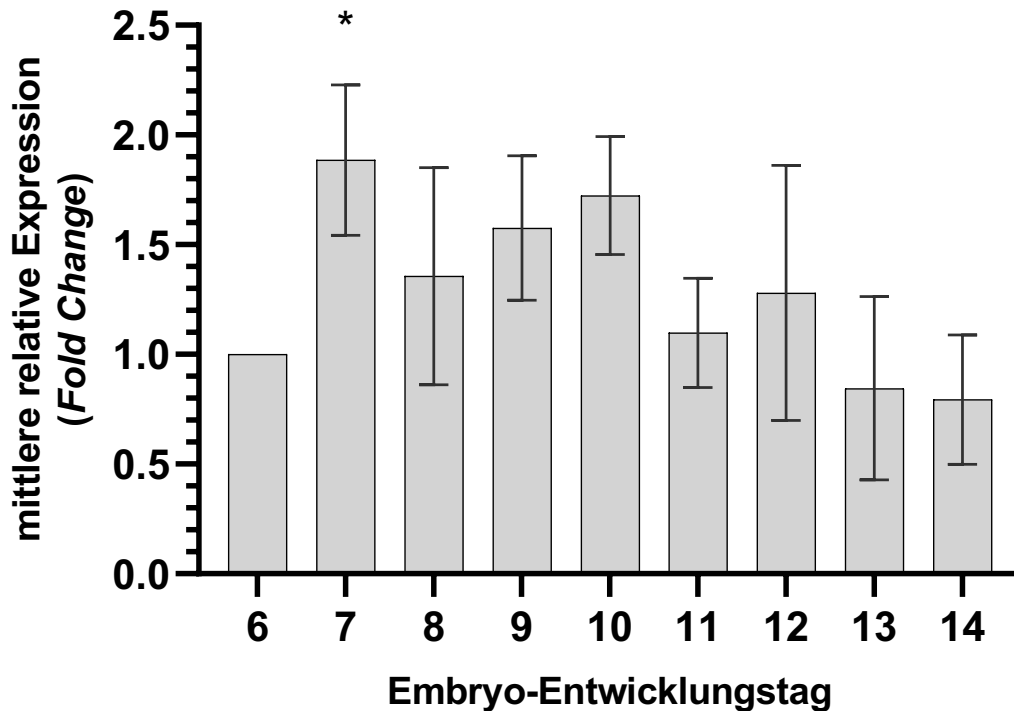


Abbildung 14: mittlere relative Expression (Fold Change) des HIF-1 α

Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren relativen Genexpression (y-Achse) von HIF1- α in der CAM an EDD 7 bis 14 (x-Achse) im Vergleich zur Expression an EDD 6 als Kontrollgruppe von drei unabhängigen Durchgängen. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA durchgeführt, um jeden EDD mit EDD 6 als Kontrollgruppe zu vergleichen, * $p \leq 0,05$, Korrektur mit dem Bonferroni-Test für multiple Mittelwertvergleiche. Die mittlere relative Expression stieg von EDD 6 auf den EDD 7 signifikant ($p \leq 0,05$) bis auf das 1,8-fache an und erreichte dort ihr Maximum. Von dort aus sank sie kontinuierlich. Die zur Analyse herangezogene Probenanzahl belief sich auf $N=73$ mit einem Minimum von $N(\text{Proben}) \geq 5$ pro Tag.

4.1.4 Stickstoffmonoxid-Synthase 2

Insgesamt ergab sich für das NOS2 eine gesteigerte mittlere relative Expression an EDD 7 bis 14. Diese erreichte an EDD 11 ein Maximum mit $4,02 \pm 2,15$, gefolgt von EDD 14 mit $2,69 \pm 1,74$. Über den gesamten Beobachtungszeitraum war keine signifikante Zu- oder Abnahme der mittleren relativen Expression zu beobachten.

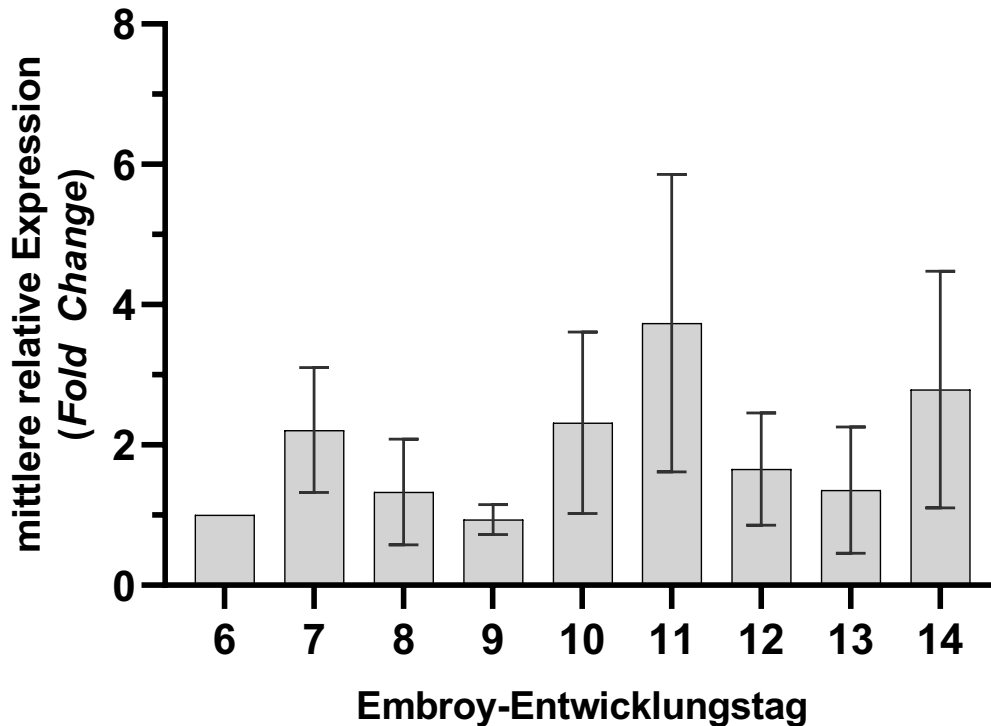


Abbildung 15: mittlere relative Expression (*Fold Change*) des NOS2

Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren relativen Genexpression (*y*-Achse) von NOS2 in der CAM an EDD 7 bis 14 (*x*-Achse) im Vergleich zur Expression an EDD 6 als Kontrollgruppe von drei unabhängigen Durchgängen. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA durchgeführt, um jeden EDD mit EDD 6 als Kontrollgruppe zu vergleichen, Korrektur mit dem Bonferroni-Test für multiple Mittelwertvergleiche. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die zur Analyse herangezogene Probenanzahl belief sich auf $N=57$ mit einem Minimum von $N(\text{Proben}) \geq 3$ pro Tag.

4.1.5 Transforming growth factor beta

Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte eine leichte Erhöhung der mittleren relativen Expression des TGF- β verglichen mit EDD 6 beobachtet werden. Diese variierte von einem Maximum mit $2,41 \pm 1,15$ an EDD 11 bis zu einem Minimum von $1,53 \pm 1,26$ an EDD 14. Keiner der untersuchten EDD erreichte eine statistische Signifikanz der veränderten Genexpression im Vergleich zu EDD 6. Die Standardabweichungen variierten von $\pm 0,45$ an EDD 9 bis $\pm 1,26$ an EDD 14.

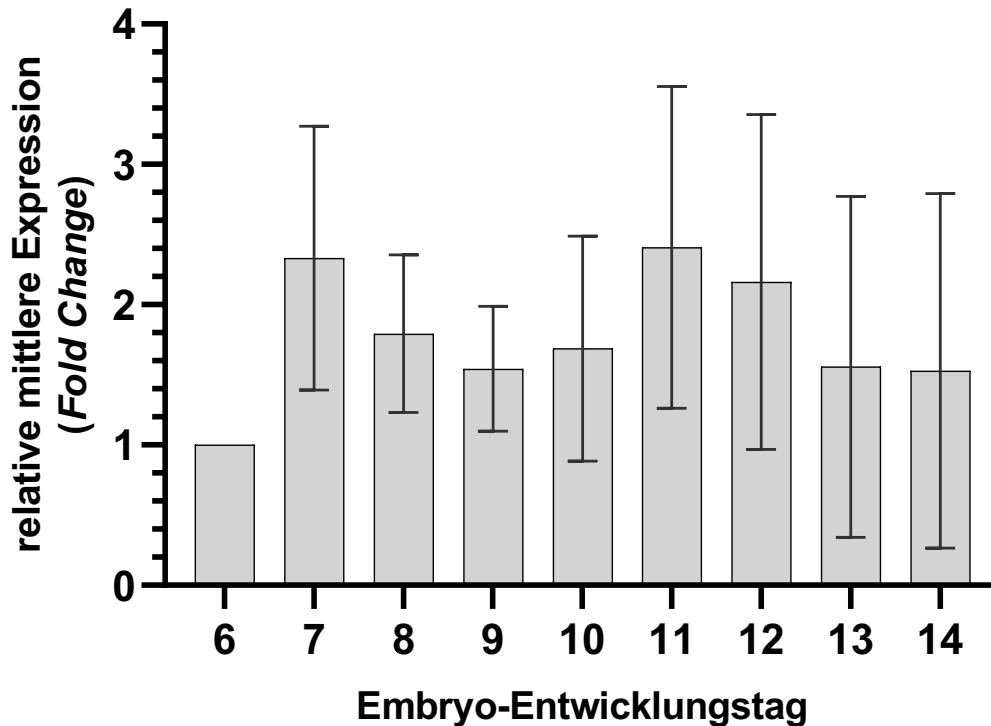


Abbildung 16: mittlere relative Expression (Fold Change) des TGF- β

Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren relativen Genexpression (y-Achse) von TGF- β in der CAM an EDD 7 bis 14 (x-Achse) im Vergleich zur Expression am EDD 6 als Kontrollgruppe von drei unabhängigen Durchgängen. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA durchgeführt, um jeden EDD mit EDD 6 als Kontrollgruppe zu vergleichen, Korrektur mit dem Bonferroni-Test für multiple Mittelwertvergleiche. Über den gesamten Beobachtungszeitraum war die mittlere relative Expression gesteigert. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die zur Analyse herangezogene Probenanzahl belief sich auf $N=73$ mit einem Minimum von $N(\text{Proben}) \geq 3$ pro Tag.

4.2 Genexpressionsanalyse mit den RT² Profiler qPCR Arrays

Die Durchführung der Arrays erfolgte jeweils mit den Proben derjenigen EDD, an denen die Bestrahlung durchgeführt wurde, den EDD 10, 12 und 14. Dabei wurden an dem jeweiligen Tag jeweils drei Arrays mit drei Proben aus drei unbehandelten Eiern und drei Arrays mit drei Proben aus drei behandelten Eiern durchgeführt, die den obig erwähnten Kontrollparametern entsprachen. Insgesamt wurden dementsprechend 18 Arrays durchgeführt, um etwaige Veränderungen der Genexpression wichtiger Angiogenese-assoziiierter Faktoren nach Bestrahlung der CAM zu detektieren. GleichermäÙen konnte die Genexpression im zeitlichen Verlauf in der Entwicklung der unbehandelten CAM beobachtet und analysiert werden. Zur Auswertung der durchgeführten Arrays wurde über das obig beschriebene Auswertungstool von QIAGEN® die mittlere relativen Genexpression (*Fold Change*) bestimmt, siehe Kapitel 3.2.6.2. GleichermäÙen wurde zwecks statistischer Untersuchung der $2^{(-\Delta ct)}$ -Wert der einzelnen Proben des jeweiligen EDD herangezogen. Anschließend erfolgte ein t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung.

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse dieser Arrays dargestellt. Kapitel 4.2.1 fokussiert sich auf die Genexpression in der unbehandelten CAM. Dafür wurden die Ergebnisse der Arrays, die mit den unbehandelten Kontrollen von EDD 10, 12 und 14 durchgeführt wurden, miteinander verglichen. Die Anzahl der Proben pro EDD entsprach $N(\text{Eier})=3$. Das Kapitel 4.2.2 befasst sich mit den Auswirkungen auf die Genexpression der CAM nach Bestrahlung mit 8 Gy. Der Zeitpunkt, an dem etwaige Veränderungen detektiert werden sollten, entsprach, gemäß dem Entnahmezeitpunkt der Proben, acht Stunden nach Bestrahlung. Dabei wurden pro EDD jeweils drei behandelte Proben mit jeweils 3 unbehandelten Proben als Kontrollgruppe verglichen, so dass auch hier $N(\text{Eier})=3$ entsprach.

4.2.1 Genexpression der unbehandelten CAM im Zeitverlauf

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels umschrieben, wurden, um etwaige Genexpressionsunterschiede in der unbehandelten CAM an den verschiedenen EDD detektieren zu können, die jeweils drei durchgeführten Arrays mit den unbehandelten Kontrollen von EDD 10, 12 und 14 miteinander verglichen. Damit wurden folgende Vergleiche möglich:

- Genexpressionsunterschiede an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 (EDD 10 als Referenzgruppe)
- Genexpressionsunterschiede an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10 (EDD 10 als Referenzgruppe)
- Genexpressionsunterschiede an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 (EDD 12 als Referenzgruppe)

4.2.1.1 Genexpressionsunterschiede an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10

An EDD 12 war im Vergleich zu EDD 10 bei insgesamt zwölf Genen eine signifikant erhöhte Genexpression zu verzeichnen. Vier dieser Gene waren um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression ≥ 2) vermehrt exprimiert. Dies waren der *Vascular endothelial growth factor D* (VEGF-D, auch: FIGF, $p < 0,01$), der Plazenta-Wachstumsfaktor (PGF, $p < 0,01$) sowie die Cyclooxygenase 1 (COX-1, auch: PTGS1, $p < 0,01$).

Betrachtet man nun, welche Gene an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 vermindert exprimiert wurden, so waren dies vier Gene, bei denen die Veränderung signifikant war. Dabei war die Expression von zwei Genen um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression $\leq 0,5$) herunterreguliert, dies waren Interleukin 8 (IL8L1, $p < 0,05$) sowie das *similar to K60 protein* (LOC422654, $p < 0,01$).

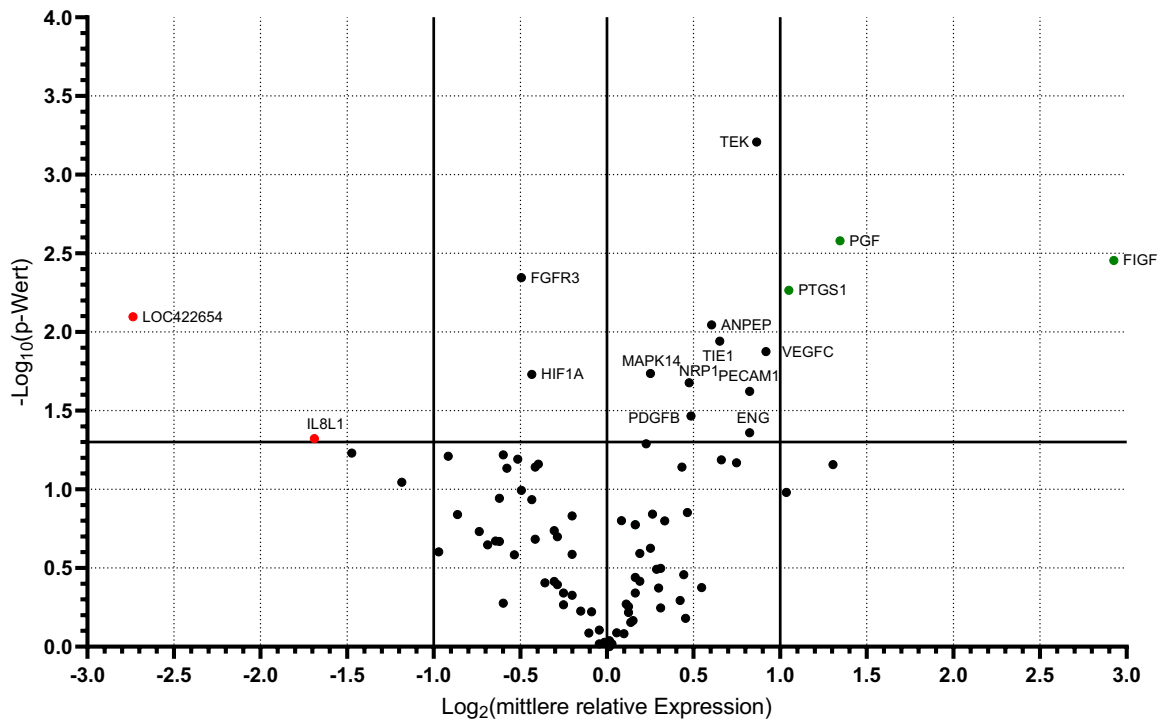


Abbildung 17: Genexpression in der unbehandelten CAM an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10

Der Volcano Plot zeigt die Genexpressionsveränderungen der unbehandelten CAM von EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 in Relation zu deren statistischer Relevanz ($N=3$). Dazu wurden auf der x-Achse die \log_2 -Werte der mittleren relativen Expression und auf die y-Achse die $-\log_{10}$ -Werte der dazugehörigen p-Werte aufgetragen. Die rechte äußere vertikale Linie markiert den Schwellenwert für eine Abweichung der mittleren relativen Expression ≥ 2 , die linke äußere vertikale Linie für eine Abweichung der mittleren relativen Expression $\leq 0,5$. Alle Punkte oberhalb der horizontalen Linie erreichten das Signifikanzniveau ($p < 0,05$), ermittelt durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung. Dazu wurden die $2^{(-\Delta ct)}$ -Werte der Proben herangezogen. Die grünen Punkte zeigen Gene, die im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermindert, und rote Punkte Gene, die um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert waren. Für zwölf Gene konnte an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 eine signifikante Zunahme der Genexpression festgestellt werden. Davon waren drei Gene um mindestens das 2-fache vermehrt exprimiert. Betrachtet man diejenigen Gene, die an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 vermindert exprimiert waren, so war der Expressionsunterschied bei vier Genen signifikant. Dabei war die Expression von zwei dieser Gene um das mindestens 2-fache herunterreguliert.

Eine genaue Aufstellung aller Gene, deren Expression an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 signifikant verändert war, ist der Tabelle 16 zu entnehmen. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse des Gesamtarrays befindet sich im Anhang, vergleiche Tabelle 31.

Ergebnisse

Tabelle 16: Signifikante Genexpressionsunterschiede der unbehandelten CAM an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10

gesteigerte Genexpression		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
CD13 (ANPEP)	1,52	0,0090
ENG	1,77	0,0436
VEGF-D (FIGF)	7,60	0,0035
PGF	2,54	0,0026
MAPK14	1,19	0,0184
NRP1	1,39	0,0210
PDGFB	1,40	0,0342
CD31 (PECAM1)	1,77	0,0239
COX-1 (PTGS1)	2,07	0,0054
TEK	1,82	0,0006
TIE1	1,57	0,0114
VEGFC	1,89	0,0133

verringerte Genexpression		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
FGFR3	0,71	0,0045
HIF1A (HIF-1 α)	0,74	0,0186
IL8L1	0,31	0,0476
LOC422654	0,15	0,0080

4.2.1.2 Genexpressionsunterschiede an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10

An EDD 14 war im Vergleich zu EDD 10 bei insgesamt acht Genen eine signifikant vermehrte Expression zu beobachten. Vier dieser Gene waren um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression ≥ 2) vermehrt exprimiert: das VEGF-D ($p < 0,05$), das PGF ($p < 0,05$), das COX-1 ($p < 0,01$) sowie das Thrombospondin 2 (THBS2, $p < 0,01$).

Betrachtet man nun, welche Gene an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10 vermindert exprimiert wurden, so waren dies 16 Gene, bei denen die Veränderung signifikant war. Dabei war die Expression von vier Genen um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression $\leq 0,5$) herunterreguliert. Dies war beim Ephrin-A2 (EFNA2), beim *EPH receptor B2* (EPHB2), beim Integrin beta 3 (CD61, auch: RP11-290H9.2), beim *leukocyte cell derived chemotaxin 1* (LECT1) sowie beim Beta-Aktin (ACTB) der Fall.

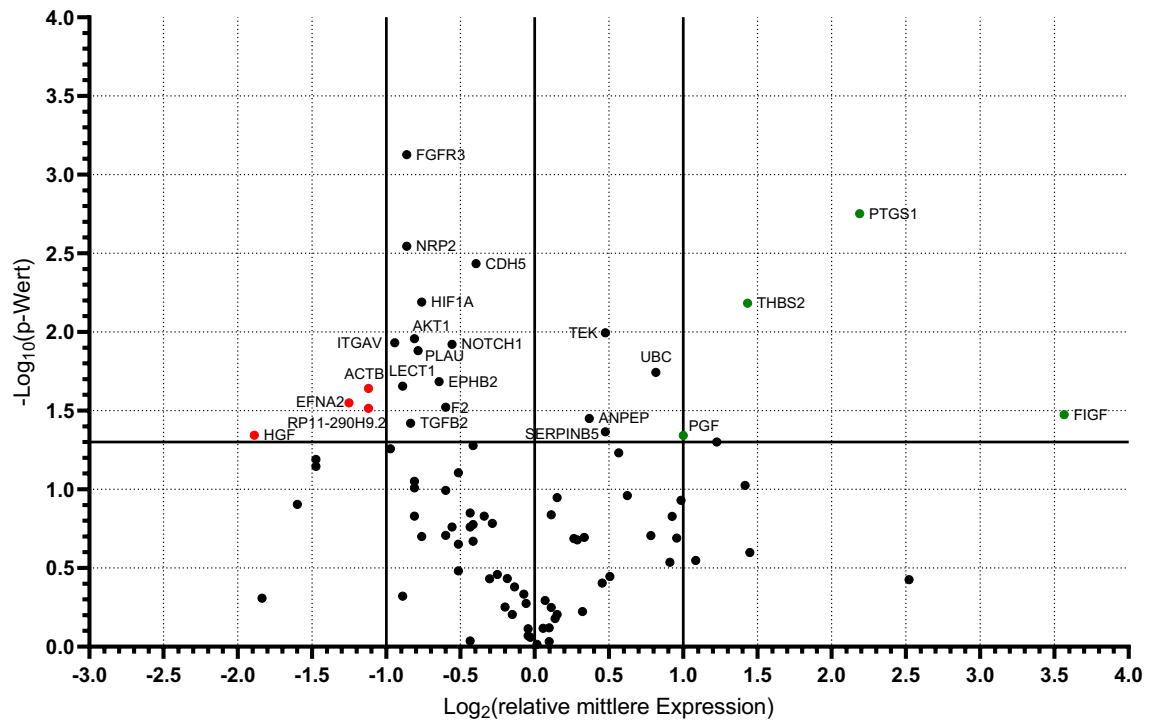


Abbildung 18: Genexpression in der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10

Der Volcano Plot zeigt die Genexpressionsveränderungen der unbehandelten CAM von EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 in Relation zu deren statistischer Relevanz ($N=3$). Dazu wurden auf der x-Achse die \log_2 -Werte der mittleren relativen Expression und auf die y-Achse die $-\log_{10}$ -Werte der dazugehörigen p-Werte aufgetragen. Die rechte äußere vertikale Linie markiert den Schwellenwert für eine Abweichung der mittleren relativen Expression ≥ 2 , die linke äußere vertikale Linie für eine Abweichung der mittleren relativen Expression $\leq 0,5$. Alle Punkte oberhalb der horizontalen Linie erreichten das Signifikanzniveau ($p < 0,05$), ermittelt durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung. Dazu wurden die $2^{(-\Delta ct)}$ -Werte der Proben herangezogen. Die grünen Punkte zeigen Gene, die im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermindert, und rote Punkte Gene, die um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert waren. Für acht Gene konnte an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 eine signifikante Zunahme der Genexpression festgestellt werden. Davon waren vier Gene um das mindestens 2-fache vermehrt exprimiert. Betrachtet man diejenigen Gene, die an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 vermindert exprimiert waren, so war der Expressionsunterschied bei 16 Genen signifikant. Dabei war die Expression von vier dieser Gene um das mindestens 2-fache herunterreguliert.

Eine genaue Aufstellung aller Gene, deren Expression an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10 signifikant verändert war, ist der Tabelle 17 zu entnehmen. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse des Gesamtarrays befindet sich im Anhang, vergleiche Tabelle 32.

Ergebnisse

Tabelle 17: Signifikante Genexpressionsunterschiede der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10

gesteigerte Genexpression		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
CD31 (ANPEP)	1,29	0,0355
VEGF-D (FIGF)	11,84	0,0335
PGF	2,00	0,0454
COX-1 (PTGS1)	4,56	0,0018
SERPINB5	1,39	0,0431
TEK	1,39	0,0101
THBS2	2,70	0,0066
UBC	1,76	0,0180

verringerte Genexpression		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
AKT1	0,57	0,0110
CDH5	0,76	0,0037
EFNA2	0,42	0,0282
EPHB2	0,64	0,0207
F2	0,66	0,0300
FGFR3	0,55	0,0007
HGF	0,27	0,0453
HIF1A (HIF-1 α)	0,59	0,0065
CD51 (ITGAV)	0,52	0,0117
CD61 (RP11-290H9.2)	0,46	0,0305
LECT1	0,54	0,0221
NOTCH1	0,68	0,0120
NRP2	0,55	0,0028
PLAU	0,58	0,0131
TGFB2	0,56	0,0380
ACTB	0,46	0,0228

4.2.1.3 Genexpressionsunterschiede an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12

Im Folgenden wurde die Expression der Gene des EDD 14 mit der Expression der Gene des EDD 12 verglichen. Dabei diente zur Errechnung der mittleren relativen Expression des EDD 12 als Referenzgruppe. Insgesamt war die Expression von drei Genen an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression ≥ 2) signifikant hochreguliert. Dies war bei der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9, $p < 0,05$), der *serin peptidase inhibitor, clade B, member 5* (SERPINB5, $p < 0,05$) sowie beim COX-1 ($p < 0,01$) der Fall.

Ergebnisse

Betrachtet man nun, welche Gene an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 vermindert exprimiert wurden, so sind es 16 Gene, bei denen der Expressionsunterschied signifikant war. Davon waren drei Gene um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression $\leq 0,5$) vermindert exprimiert. Dies waren die Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP14, $p < 0,05$), das LECT1 ($p < 0,05$) sowie das Neuropillin 2 (NRP2, $p < 0,01$).

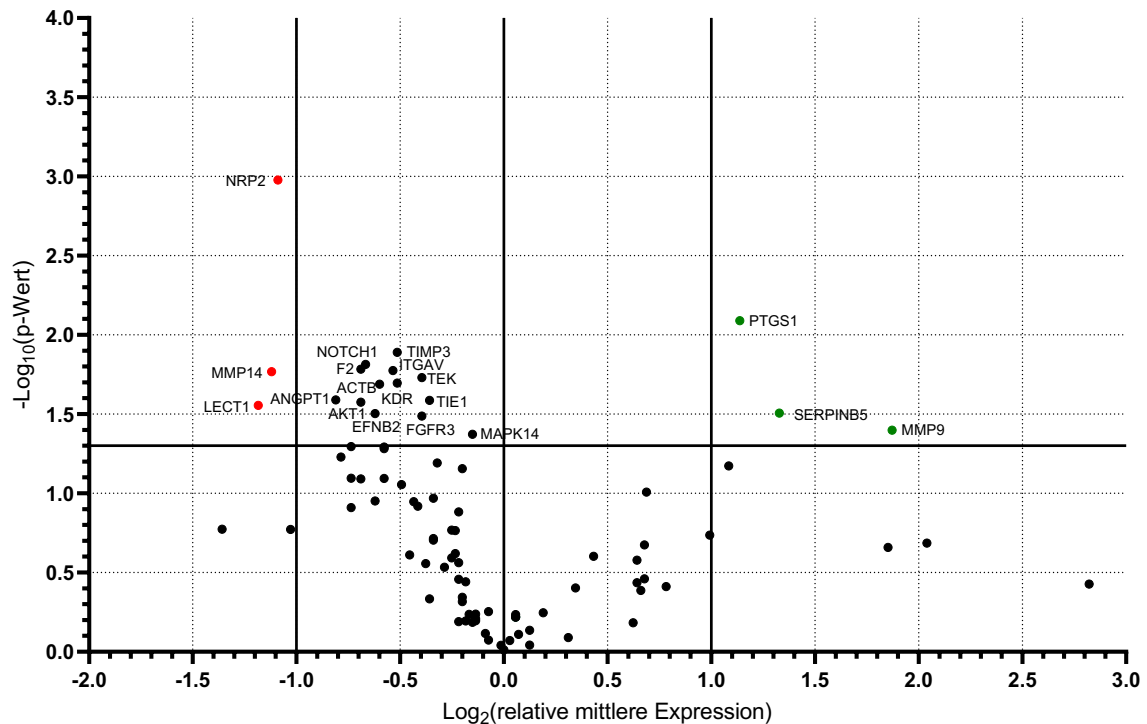


Abbildung 19: Genexpression in der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12

Der Volcano Plot zeigt die Genexpressionsveränderungen der unbehandelten CAM von EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 in Relation zu deren statistischer Relevanz ($N=3$). Dazu wurden auf der x-Achse die \log_2 -Werte der mittleren relativen Expression und auf die y-Achse die $-\log_{10}$ -Werte der dazugehörigen p-Werte aufgetragen. Die rechte äußere vertikale Linie markiert den Schwellenwert für eine Abweichung der mittleren relativen Expression ≥ 2 , die linke äußere vertikale Linie für eine Abweichung der mittleren relativen Expression $\leq 0,5$. Alle Punkte oberhalb der horizontalen Linie erreichten das Signifikanzniveau ($p < 0,05$), ermittelt durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung. Dazu wurden die $2^{(-\Delta ct)}$ -Werte der Proben herangezogen. Die grünen Punkte zeigen Gene, die im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermindert, und rote Punkte Gene, die um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert waren. Drei Gene waren an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert. Betrachtet man diejenigen Gene, die an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 vermindert exprimiert waren, so war der Expressionsunterschied bei 16 Genen signifikant. Dabei war die Expression von drei dieser Gene um das mindestens 2-fache herunterreguliert.

Ergebnisse

Eine genaue Aufstellung aller Gene, deren Expression an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 signifikant verändert war, ist der Tabelle 18 zu entnehmen. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse des Gesamtarrays befindet sich im Anhang, vergleiche Tabelle 33.

Tabelle 18: Signifikante Genexpressionsunterschiede der unbehandelten CAM an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12

<i>gesteigerte Genexpression</i>		
Gen	mittlere relative Expression (<i>Fold Change</i>)	p-Wert
MMP9	3,66	0,0400
COX-1 (PTGS1)	2,20	0,0081
SERPIN5	2,51	0,0312

<i>verringerte Genexpression</i>		
Gen	mittlere relative Expression (<i>Fold Change</i>)	p-Wert
AKT1	0,66	0,0205
ANGPT1	0,57	0,0257
EFNB2	0,65	0,0314
F2	0,62	0,0164
FGFR3	0,76	0,0325
CD51 (ITGAV)	0,69	0,0168
VEGFR2 (KDR)	0,70	0,0201
LECT1	0,44	0,0279
MAPK14	0,90	0,0424
MMP14	0,46	0,0171
NOTCH1	0,63	0,0153
NRP2	0,47	0,0011
TEK	0,76	0,0186
TIE1	0,78	0,0259
TIMP3	0,70	0,0129
ACTB	0,62	0,0266

4.2.1.4 Gemeinsamkeiten der Genexpressionsveränderungen in der unbehandelten CAM in Hinblick auf die untersuchten EDD 10, 12, 14

Der folgende Abschnitt dient der übersichtlichen Darstellung der Genexpression der unbehandelten CAM im Zeitverlauf. Er widmet sich denjenigen Genen, die in allen der zuvor beschriebenen Tagesvergleiche mit Proben der unbehandelten CAM an EDD 10, 12 und 14 eine gleiche Tendenz in Hinblick auf eine Zu- oder Abnahme der Genexpression aufweisen konnten. Dabei wurden nur diejenigen Gene berücksichtigt, bei denen an mindestens zwei Tagesvergleichen die mittlere relative Expression (*Fold Change*) das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreichte. Eine Übersicht dieser Gene ist der Tabelle 19 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tabelle 19: Tabellarische Übersicht derjenigen Gene, deren Genexpression an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10, an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 und an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10 eine gleiche Tendenz in Hinblick auf eine Zu- oder Abnahme der Genexpression aufweisen konnten.

Einbezogen wurden Gene, deren mittlere relative Expression an mindestens zwei der Tagesvergleiche das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ erreichen konnten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)		
	EDD 12 im Vergleich zu EDD 10	EDD 14 im Vergleich zu EDD 12	EDD 14 im Vergleich zu EDD 10
FGFR3	0,71**	0,76*	0,55***
COX-1 (PTGS1)	2,07**	2,2**	4,56**
AKT1	0,87	0,66*	0,57*
CD51 (ITGAV)	0,75	0,69*	0,52*
ACTB	0,74	0,62*	0,46*
VEGF-D (FIGF)	7,6**	1,56	11,84*
HIF1A (HIF-1 α)	0,74*	0,79	0,59**

Insgesamt waren es fünf Gene, bei denen über alle Tagesvergleiche hinweg eine Abnahme der Genexpression beobachtet werden konnte. Dies waren der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR3), das *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (AKT1), das Integrin alpha-V (CD51, auch: ITGAV), das ACTB und das HIF1 α .

Der FGFR3 wurde im Vergleich von EDD 12 zu EDD 10 vermindert exprimiert, die mittlere relative Expression betrug 0,71. Im Vergleich von EDD 14 zu EDD 12 konnte eine ähnliche mittlere relative Expression von 0,76 festgestellt werden, was gleichermaßen eine verminderte Genexpression bedeutete. Vergleicht man nun den EDD 14 mit dem EDD 10, so konnte eine mittlere relative Expression von 0,55 festgestellt werden, sodass innerhalb dieses Zeitraums eine Gesamtabnahme um das in etwa 1,8-fache beobachtet werden konnte.

Das AKT1, das CD51 und das ACTB wiesen ähnliche Expressionsmuster auf. Alle drei Gene waren an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 vermindert exprimiert, wenngleich keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Gleichermäßen konnte für die Gene mit 0,87 (AKT1), 0,69 (CD51) und 0,62 (ACTB) eine verminderte mittlere relative Expression an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 beobachtet werden. Vergleicht man nun die

Ergebnisse

mittlere relative Expression des EDD 14 mit EDD 12, so war das AKT1 über den gesamten Zeitraum der Untersuchung um das in etwa 1,8-fache, das CD51 um das 1,9-fache und das ACTB um das in etwa 2,2-fache vermindert exprimiert.

Auch das HIF-1 α war an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 mit einer mittleren relativen Expression von 0,74 vermindert exprimiert. Betrachtet man die Expression des Gens an EDD 14 verglichen mit EDD 12, so kann ebenfalls eine Abnahme festgestellt werden, diese erreicht jedoch nicht das Signifikanzniveau. Vergleicht man nun die mittlere relative Expression des HIF-1 α von EDD 14 mit EDD 10, so kann über den gesamten Zeitraum der Untersuchung eine Abnahme um das in etwa 1,7-fache beobachtet werden.

Bei lediglich zwei Genen konnte über alle Tagesvergleiche hinweg eine Zunahme der Genexpression beobachtet werden. Diese waren das COX-1 und das VEGF-D. Das COX-1 wurde im Vergleich von EDD 12 zu EDD 10 um das in etwa 2-fache vermehrt exprimiert. Auch im Vergleich von EDD 14 zu EDD 12 war es um das 2,2-fache vermehrt exprimiert. Vergleicht man nun die mittlere relative Expression des COX-1 von EDD 14 mit EDD 10, so kann über den gesamten Zeitraum der Untersuchung eine Zunahme um das in etwa 4,6-fache beobachtet werden. Gleichermaßen war das VEGF-D an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 vermehrt exprimiert. Auch an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 konnte eine vermehrte Expression beobachtet werden, wenngleich diese das Signifikanzniveau nicht erreichte. Betrachtet man die mittlere relative Expression des VEGF-D an EDD 14 im Vergleich zu EDD 10, so konnte eine Gesamtzunahme der Genexpression in der unbehandelten CAM um das in etwa 11,8-fache beobachtet werden.

Für alle der 82 untersuchten Gene wurden unabhängig vom Signifikanzniveau Genexpressionstrends herausgesucht, bei denen sich sowohl beim Vergleich zwischen EDD 10 und EDD 12 als auch zwischen EDD 12 und EDD 14 jeweils eine Reduktion oder ein Anstieg der Genexpression zeigte. Dabei wurden die Gene je nach Trend kategorisiert. Dadurch ließen sich insgesamt fünf verschiedene Trend-Kategorien aufschlüsseln:

1. Gene, deren Expression in beiden Vergleichen vermindert war
2. Gene, deren Expression in beiden Vergleichen vermehrt war
3. Gene, deren Expression von EDD 10 zu EDD 12 hin zu- und von EDD 12 zu EDD 14 hin abnahm

Ergebnisse

4. Gene, deren Expression von EDD 10 zu EDD 12 hin ab- und von EDD 12 zu EDD 14 hin zunahm
5. Gene, deren Expression an einem der gezogenen Tagesvergleiche unverändert exprimiert war.

Eine Übersicht über diese Genexpressionstrends ist der Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Übersicht über Genexpressionszu- und abnahmen der Tagesvergleiche EDD 12 mit EDD 10 und EDD 14 mit EDD 12 mit den RT² qPCR Profiler Arrays

	An allen Tagesvergleichen vermindert exprimiert	An allen Tagesvergleichen vermehrt exprimiert	Zunahme der Expression von EDD 10 auf EDD 12 und Abnahme der Expression von EDD 12 auf EDD 14	Abnahme der Expression von EDD 10 auf EDD 12 und Zunahme der Expression von EDD 12 auf EDD 14	An einem der Tagesvergleiche unverändert exprimiert
Gene	AKT1, Ang2, BAI3, VE-Cadherin, COL18A1, EFNA2, EPHB2, FGF2, FGFR3, FN1, HGF, HIF1A, IL6, IL8L1, CD51, CD61, PDGFA, PLAU, SERPINE2, SERPINF1, TGFA, TGFB2, TGFB3, TIMP3, VEGFA	ANG, ANGPTL4, COL4A3, CSF3, F3, FGF6, VEGF-D, IFNA3, IFNB, IFNG, COX-1, THBS2	Ang1, CD13, EDNRA, EFNB2, ENG, EPAS1, ERBB2, F2, VEGFR1, ID1, IGF1, JAG1, VEGFR2, LECT1, LITAF, PGF, MAPK14, MMP14, MMP2, NOS3, NOTCH1, NRP1, NRP2, PDGFB, CD31, PTK2, S1PR1, SPHK1, TBX1, TEK, TGFB1, TIE1, VEGFC	CTGF, EDN1, EGF, FGF1, IL1B, LOC422654, MDK, MMP9, PLG, PROK2, SERPINB5, THBS1	TIMP2
Anzahl	25	13	33	12	1

4.2.2 Bestrahlung der nativen CAM

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, werden in diesem Abschnitt die Auswirkungen der Genexpression in der CAM nach Anwendung von Röntgenstrahlung dargestellt. Mit den durchgeführten Arrays konnten folgende Vergleiche gezogen werden:

- Genexpressionsunterschiede zwischen der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 10, sechs Stunden nach Bestrahlung
- Genexpressionsunterschiede zwischen der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 12, sechs Stunden nach Bestrahlung

- Genexpressionsunterschiede zwischen der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 14, sechs Stunden nach Bestrahlung

4.2.2.1 Strahlenwirkung auf die Genexpression in der CAM an EDD 10

An EDD 10 war in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen ausschließlich beim Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) eine signifikant vermehrte Expression um das in etwa 1,9-fache ($p < 0,05$) zu beobachten. Keines der Gene wurde um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression ≥ 2) vermehrt exprimiert.

Betrachtet man nun, welche Gene in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrolle vermindert exprimiert wurden, so sind es sieben Gene, bei denen der Expressionsunterschied signifikant ($p < 0,05$) war. Zwei dieser Gene waren um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression $\leq 0,5$) vermindert exprimiert, dies waren der *Vascular endothelial growth factor-receptor 2* (VEGFR2, auch: KDR, $p < 0,05$) und das TEK ($p < 0,001$).

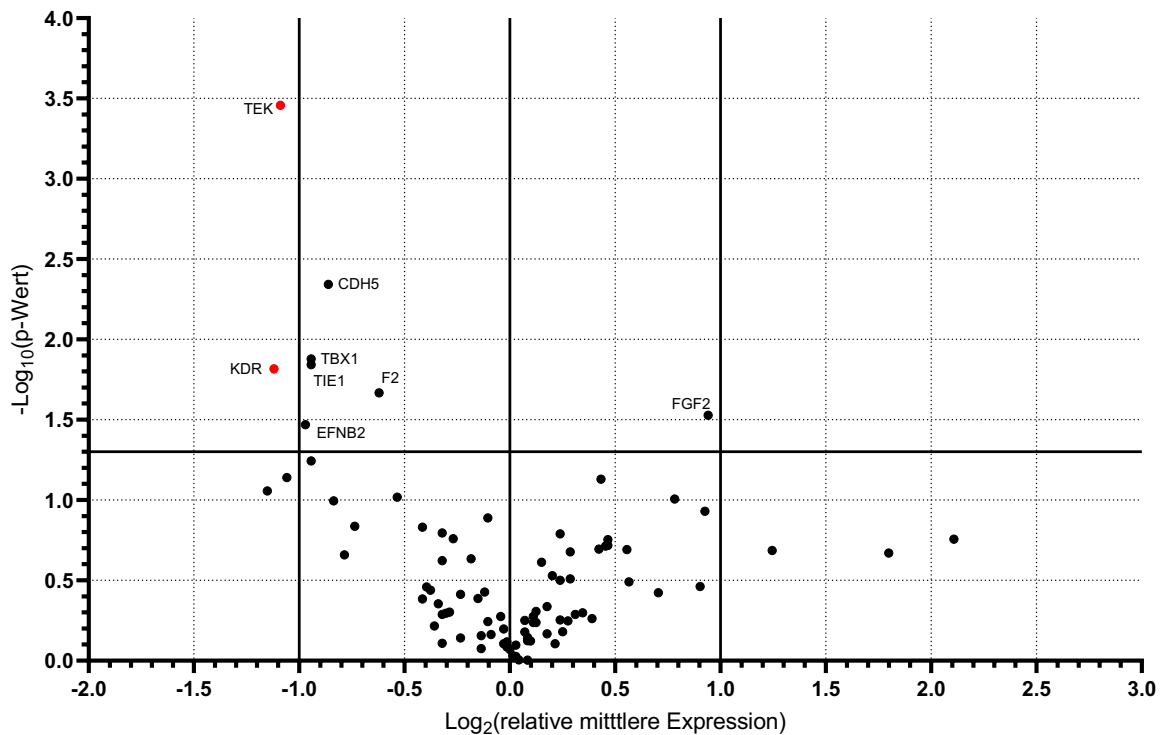


Abbildung 20: Darstellung der veränderten Genexpression der behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an EDD 10 (6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy)

Der Volcano Plot zeigt die Genexpressionsveränderungen der bestrahlten Proben der CAM im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 10 in Relation zu deren statistischer Relevanz, 6 Stunden nach Bestrahlung ($N=3$). Dazu wurden auf der x-Achse die \log_2 -Werte der mittleren relativen Expression und auf die y-Achse die $-\log_{10}$ -Werte der dazugehörigen p-Werte aufgetragen. Die rechte äußere vertikale Linie markiert den Schwellenwert für eine Abweichung der mittleren relativen Expression ≥ 2 , die linke äußere vertikale Linie für eine Abweichung der mittleren relativen Expression $\leq 0,5$. Alle Punkte oberhalb der horizontalen Linie erreichten das Signifikanzniveau ($p < 0,05$), ermittelt durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung. Dazu wurden die $2^{(-\Delta ct)}$ -Werte der Proben herangezogen. Die grünen Punkte zeigen Gene, die im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermindert, und rote Punkte Gene, die um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert waren. Ein Gen war in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten Kontrolle an EDD 10 signifikanter vermehrt exprimiert. Betrachtet man diejenigen Gene, die in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten Proben an EDD vermindert exprimiert waren, so war der Expressionsunterschied bei sieben Genen signifikant. Dabei war die Expression von zwei dieser Gene um das mindestens 2-fache herunterreguliert.

Eine genaue Aufstellung aller Gene, deren Expression in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 10 signifikant verändert war, ist der Tabelle 21 zu entnehmen. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse des Gesamtarrays befindet sich im Anhang, vergleiche Tabelle 34.

Ergebnisse

Tabelle 21: Signifikante Genexpressionsunterschiede in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen in der CAM an EDD 10, 6 Stunden nach Bestrahlung

gesteigerte Genexpression		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
FGF2	1,92	0,0297

verringerte Genexpression		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
CDH5	0,55	0,0045
EFNB2	0,51	0,0340
F2	0,65	0,0215
VEGFR2 (KDR)	0,46	0,0152
TBX1	0,52	0,0132
TEK	0,47	0,0003
TIE1	0,52	0,0144

4.2.2.2 Strahlenwirkung auf die Genexpression in der CAM an EDD 12

An EDD 12 war in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten Kontrollen bei 20 Genen eine signifikant vermehrte Expression zu beobachten ($p < 0,05$). Bei zwölf dieser Gene war die mittlere relative Expression um das mindestens 2-fache (mittlere relative Expression ≥ 2) erhöht. Dies waren das *Angiopoietin-like protein 4* (ANGPTL4, $p < 0,05$), das FGF2 ($p < 0,05$), der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF, $p < 0,05$), das Interleukin 6 (IL6, $p < 0,001$), das CD61 ($p < 0,01$), das LOC422654 ($p < 0,01$), das MMP9 ($p < 0,05$), das Prokineticin 2 (PROK2, $p < 0,01$), das SERPINB5 ($p < 0,05$), der *Transforming growth factor alpha* (TGF α , $p < 0,01$), das Thrombospondin 1 (THBS1, $p < 0,05$) sowie der *tissue inhibitor of metalloproteinases 2* (TIMP2, $p < 0,05$).

Betrachtet man nun, welche Gene in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrolle an EDD 12 vermindert exprimiert wurden, so waren das 23 Gene, bei denen der Expressionsunterschied signifikant ($p < 0,05$) war. Sieben dieser Gene waren um das mindestens 2-fache vermindert (mittlere relative Expression $\leq 0,5$) exprimiert. Diese waren das Ephrin B2 (EFNB2, $p < 0,01$), das VEGF-D ($p < 0,01$), der VEGFR2 ($p < 0,001$), das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (CD31, auch: PECAM1, $p < 0,01$), das TEK ($p < 0,001$), die *Tyrosine Kinase With Ig And EGF Homology Domains-1* (TIE1, $p < 0,001$) und der *Vascular endothelial growth factor C* (VEGF-C, $p < 0,01$).

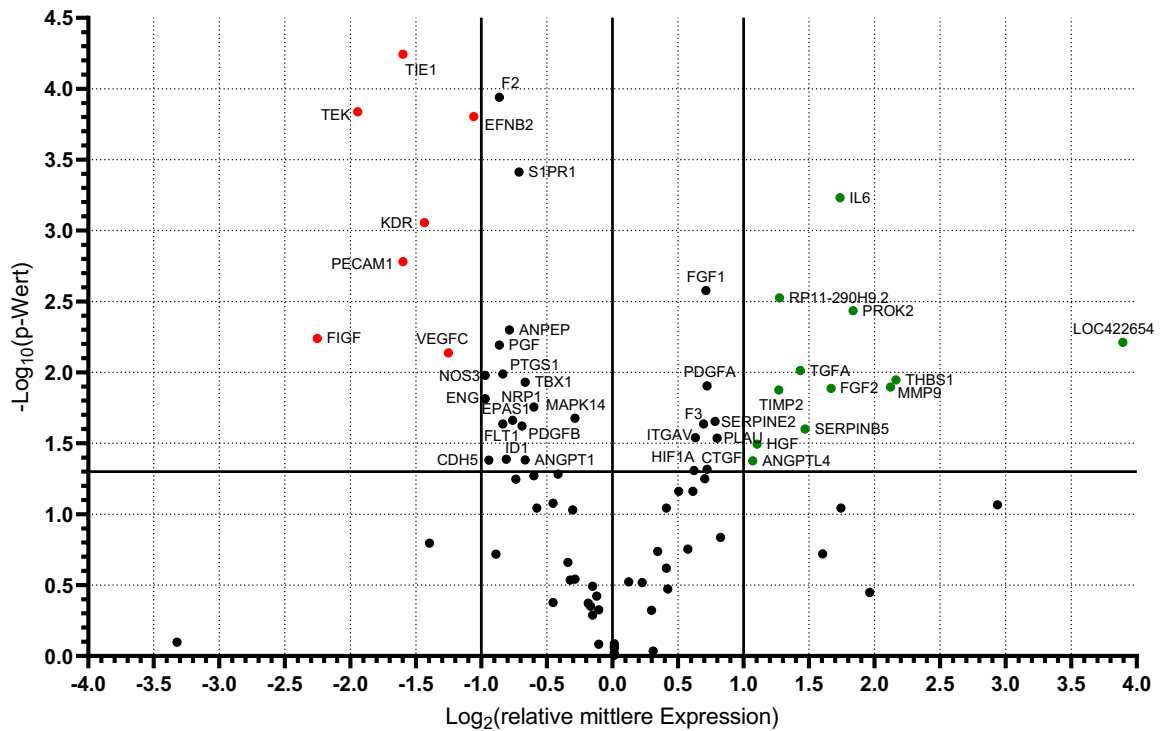


Abbildung 21: Darstellung der veränderten Genexpression der behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an EDD 12 (6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy)

Der *Vulcano Plot* zeigt die Genexpressionsveränderungen der bestrahlten Proben der CAM im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 12 in Relation zu deren statistischer Relevanz, 6 Stunden nach Bestrahlung (N=3). Dazu wurden auf der x-Achse die \log_2 -Werte der mittleren relativen Expression und auf die y-Achse die $-\log_{10}$ -Werte der dazugehörigen p-Werte aufgetragen. Die rechte äußere vertikale Linie zeigt den Schwellenwert für eine Abweichung der mittleren relativen Expression ≥ 2 , die linke äußere vertikale Linie eine Abweichung der mittleren relativen Expression $\leq 0,5$. Alle Punkte oberhalb der horizontalen Linie erreichten das Signifikanzniveau ($p < 0,05$), ermittelt durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung. Dazu wurden die $2^{(-\Delta ct)}$ -Werte der Proben herangezogen. Die grünen Punkte zeigen Gene, die im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermindert, und rote Punkte Gene, die um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert waren. Für 20 Gene konnte in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 12 eine signifikante Zunahme der Genexpression festgestellt werden. Davon waren zwölf Gene um das mindestens 2-fache vermehrt exprimiert. Betrachtet man diejenigen Gene, die in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 12 vermindert exprimiert waren, so war der Expressionsunterschied bei 23 Genen signifikant. Dabei war die Expression von sieben dieser Gene um das mindestens 2-fache herunterreguliert.

Eine genaue Aufstellung aller Gene, deren Expression in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 12 signifikant verändert war, ist der Tabelle 22 zu entnehmen. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse des Gesamtarrays befindet sich im Anhang, vergleiche Tabelle 35.

Ergebnisse

Tabelle 22: Signifikante Genexpressionsunterschiede in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen in der CAM an EDD 12, 6 Stunden nach Bestrahlung

<i>gesteigerte Genexpression</i>		
Gen	mittlere relative Expression (<i>Fold Change</i>)	p-Wert
ANGPTL4	2,10	0,0420
CTGF	1,65	0,0483
F3	1,62	0,0231
FGF1	1,64	0,0026
FGF2	3,18	0,0130
HGF	2,15	0,0321
HIF1A (HIF-1 α)	1,54	0,0492
IL6	3,33	0,0006
CD51 (ITGAV)	1,55	0,0288
CD61 (RP11-290H9.2)	2,42	0,0030
LOC422654	14,87	0,0061
MMP9	4,35	0,0127
PDGFA	1,65	0,0125
PLAU	1,74	0,0291
PROK2	3,57	0,0037
SERPIN5	2,77	0,0250
SERPINE2	1,72	0,0221
TGFA	2,70	0,0097
THBS1	4,48	0,0113
TIMP2	2,41	0,0133

<i>verringerte Genexpression</i>		
Gen	mittlere relative Expression (<i>Fold Change</i>)	p-Wert
ANGPT1	0,63	0,0414
CD13 (ANPEP)	0,58	0,0050
CDH5	0,52	0,0415
EFNB2	0,48	0,0002
ENG	0,51	0,0153
EPAS1	0,59	0,0217
F2	0,55	0,0001
VEGF-D (FIGF)	0,21	0,0058
VEGFR1 (FLT1)	0,56	0,0231
ID1	0,57	0,0410
VEGFR2 (KDR)	0,37	0,0009
PGF	0,55	0,0064
MAPK14	0,82	0,0211
NOS3	0,51	0,0105
NRP1	0,66	0,0175
PDGFB	0,62	0,0239
CD31 (PECAM1)	0,33	0,0017
COX-1 (PTGS1)	0,56	0,0103
S1PR1	0,61	0,0004
TBX1	0,63	0,0117

Ergebnisse

verringerte Genexpression		
TEK	0,26	0,0001
TIE1	0,33	0,0001
VEGFC	0,42	0,0073

4.2.2.3 Strahlenwirkung auf die Genexpression in der CAM an EDD 14

An EDD 14 war in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten Kontrollen bei neun Genen eine signifikant vermehrte Expression zu beobachten ($p < 0,05$). Bei einem dieser Gene war die mittlere relative Expression um das mindestens 2-fache erhöht, dies war das SERPINB5 ($p < 0,05$).

Betrachtet man nun, welche Gene in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrolle vermindert exprimiert wurden, so sind es zehn Gene, bei denen der Expressionsunterschied signifikant ($p < 0,05$) war. Fünf dieser Gene waren um das mindestens 2-fache vermindert exprimiert (mittlere relative Expression $\leq 0,5$). Dies waren der *insuline-like growth factor 1* (IGF1, $p < 0,01$), der VEGFR2 ($p < 0,01$), das CD31 ($p < 0,05$), das TEK ($p < 0,01$) und das TIE1 ($p < 0,01$).

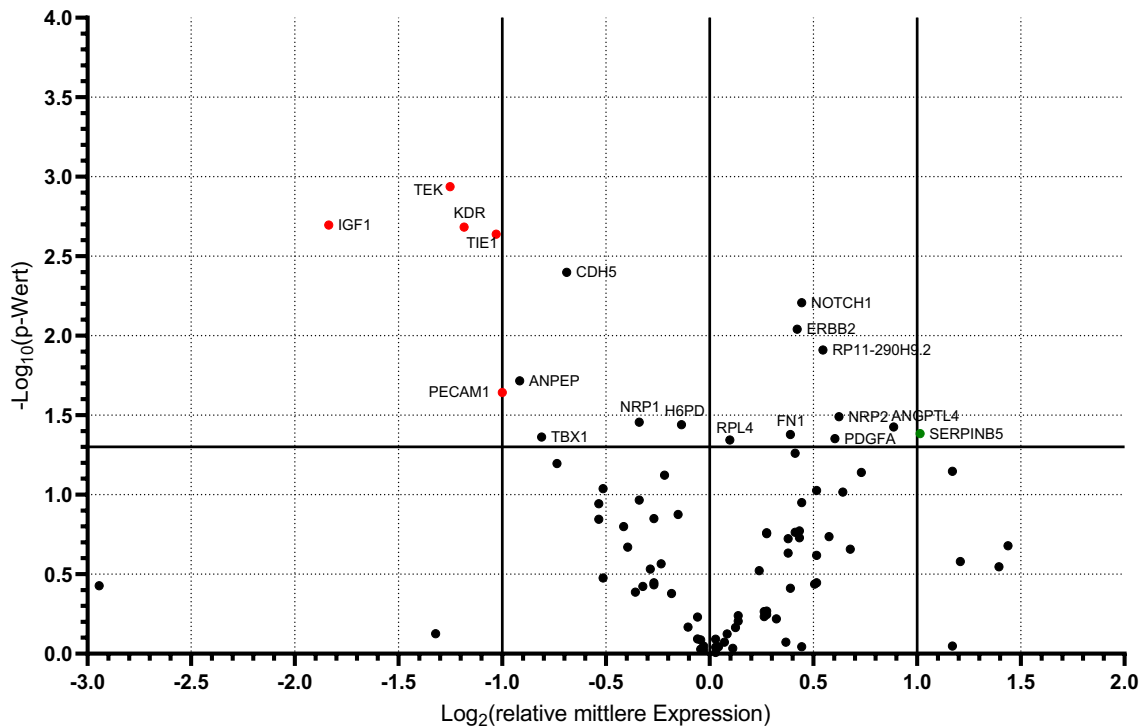


Abbildung 22: Darstellung der veränderten Genexpression der behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an EDD 14 (6 Stunden nach Bestrahlung)

Der *Vulcano Plot* zeigt die Genexpressionsveränderungen der bestrahlten Proben der CAM im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 14 in Relation zu deren statistischer Relevanz, 6 Stunden nach Bestrahlung ($N=3$). Dazu wurden auf der x-Achse die \log_2 -Werte der mittleren relativen Expression und auf die y-Achse die $-\log_{10}$ -Werte der dazugehörigen p-Werte aufgetragen. Die rechte äußere vertikale Linie zeigt den Schwellenwert für eine Abweichung der mittleren relativen Expression ≥ 2 , die linke äußere vertikale Linie für eine Abweichung der mittleren relativen Expression $\leq 0,5$. Alle Punkte oberhalb der horizontalen Linie erreichten das Signifikanzniveau ($p < 0,05$), ermittelt durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung. Dazu wurden die $2^{(-\Delta ct)}$ -Werte der Proben herangezogen. Die grünen Punkte zeigen Gene, die im Vergleich zu EDD 12 um das mindestens 2-fache signifikant vermindert, und rote Punkte Gene, die um das mindestens 2-fache signifikant vermehrt exprimiert waren. Neun Gene wiesen in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 14 eine signifikante Zunahme der Genexpression auf. Davon war ein Gen um das mindestens 2-fache vermehrt exprimiert. Betrachtet man diejenigen Gene, die in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 14 vermindert exprimiert waren, so war der Expressionsunterschied bei zehn Genen signifikant. Dabei war die Expression von fünf dieser Gene um das mindestens 2-fache herunterreguliert.

Eine genaue Aufstellung aller Gene, deren Expression in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten Kontrollen an EDD 14 signifikant verändert war, ist der Tabelle 23 zu entnehmen. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse des Gesamtarrays befindet sich im Anhang, vergleiche Tabelle 36.

Ergebnisse

Tabelle 23: Signifikante Genexpressionsunterschiede in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrollen in der CAM an EDD 14, 6 Stunden nach Bestrahlung

<i>gesteigerte Genexpression</i>		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
ANGPTL4	1,85	0,0375
ERBB2	1,34	0,0091
FN1	1,31	0,0418
CD61 (RP11-290H9.2)	1,46	0,0123
NOTCH1	1,36	0,0062
NRP2	1,54	0,0323
PDGFA	1,52	0,0443
SERPINB5	2,02	0,0413
RPL4	1,07	0,0453

<i>verringerte Genexpression</i>		
Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)	p-Wert
CD13 (ANPEP)	0,53	0,0192
CDH5	0,62	0,0040
IGF1	0,28	0,0020
VEGFR2 (KDR)	0,49	0,0023
NRP1	0,79	0,0350
CD31 (PECAM1)	0,50	0,0228
TBX1	0,57	0,0434
TEK	0,42	0,0012
TIE1	0,44	0,0021
H6PD	0,91	0,0363

4.2.2.4 Gemeinsamkeiten der Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung der CAM (6 Stunden) an EDD 10, 12 und 14

In dem folgenden Abschnitt werden diejenigen Gene betrachtet, die an mindestens zwei der betrachteten EDD sechs Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikant veränderte mittlere relative Expression ($p < 0,05$) aufwiesen. In Anlehnung an das Kapitel 4.2.1.4 werden auch hier diejenigen Gene beschrieben, bei denen eine gleiche Tendenz in Hinblick auf eine Zu- oder Abnahme der Genexpression zu beobachten war. Eine definierte Ausschlussgrenze aufgrund der mittleren relativen Expression findet dabei keine Anwendung. Eine Übersicht über diese sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tabelle 24: Übersicht über gemeinsame signifikante Genexpressionsunterschiede der bestrahlten Proben der CAM im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen an EDD 10, 12, 14.

Einbezogen wurden all diejenigen Gene, bei denen an allen untersuchten EDD entweder nur Genexpressionsabnahmen oder nur Zunahmen der Expression (gleiche Tendenz an allen EDD) beobachtet werden konnten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Gen	mittlere relative Expression (Fold Change)		
	EDD 10	EDD 12	EDD 14
CDH5	0,55**	0,52*	0,62**
VEGFR2 (KDR)	0,46*	0,37***	0,49**
TBX1	0,52*	0,63*	0,57*
TEK	0,47***	0,26***	0,42**
TIE1	0,52*	0,33***	0,44**
EFNB2	0,51*	0,48***	0,69
ANGPTL4	1,90	2,1*	1,85*
CD13 (ANPEP)	0,88	0,58**	0,53*
CD61 (RP11-290H9.2)	1,47	2,42**	1,46*
NRP1	0,93	0,66*	0,79*
PDGFA	1,13	1,65*	1,52*
CD31 (PECAM1)	0,52	0,33**	0,5*
SERPINB5	1,34	2,77*	2,02*

Bei fünf Genen konnten sechs Stunden nach Bestrahlung signifikante Genexpressionsveränderungen an allen EDD im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese waren das vaskulär-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin/CDH5), der VEGFR2, der T-box 1 (TBX1), das Tek sowie der TIE1. Alle diese Gene waren um das mindestens 1,5-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vermindert exprimiert.

Ein weiteres Gen, welches über alle EDD hinweg in den behandelten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert wurde, war das EFNB2. Dabei konnte an EDD 10 und 12 jeweils in etwa eine ähnliche signifikante Abnahme der Genexpression um das 2-fache beobachtet werden. An EDD 14 wiederum war das EFNB2 lediglich um das in etwa 1,5-fache vermindert exprimiert und der Genexpressionsunterschied konnte kein Signifikanzniveau erreichen.

Darüber hinaus konnten drei weitere Gene beobachtet werden, bei denen über alle EDD hinweg in den behandelten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Abnahme der Genexpression stattgefunden hat. Dabei waren die Genexpressionsabnahmen nur an EDD 12 und 14 signifikant, nicht jedoch an EDD 10. Bei den Genen handelte es sich um die Alanin-Amino-peptidase (CD13, auch: ANPEP), das Neuropilin 1

Ergebnisse

(NRP1) sowie das CD31. An EDD 12 und 14 war bei diesen Genen die mittlere relative Expression der Gene um das mindestens 1,5-fache verringert. An EDD 10 war bei dem ANPEP und dem NRP die Abnahme der Genexpression um das lediglich in etwa 1,1-fache vergleichsweise gering, während das CD31 an EDD 10 in den behandelten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe um das in etwa 1,9-fache vermindert exprimiert war.

Betrachtet man nun, welche Gene an allen EDD 12 und 14 sechs Stunden nach Bestrahlung in den behandelten Proben im Vergleich zu den Proben der unbehandelten Kontrolle eine signifikant vermehrte Genexpression aufweisen konnten, so sind es das ANGPTL4, das CD61, der *Platelet-derived growth factor alpha polypeptide* (PDGFA) sowie das SERPINB5. Auch diese Gene wiesen nur an den EDD 12 und 14 eine signifikante Genexpressionszunahme nach Bestrahlung auf. Dabei war die mittlere relative Expression der Gene an diesen beiden EDD um das mindestens 1,4-fache gesteigert. An EDD 10 war in der Gruppe der behandelten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe das PDGFA um das in etwa 1,1-fache, das SERPINB5 um das in etwa 1,3-fache und das ANGPTL4 um das 1,9-fache vermehrt exprimiert.

5 Diskussion

Das CAM-Assay ist als alternatives Modellsystem zu *in vitro* Zellkultursystemen und *in vivo* Nagetierversuchen etablierter Bestandteil der biomedizinischen Forschung. Und obschon die CAM für vielfältige Fragestellungen verwendet wird, sind grundlegende Mechanismen dieses vielversprechenden Systems bis zum jetzigen Zeitpunkt unverstanden, so auch die Genexpression wichtiger Angiogenese-assoziiierter Faktoren im Zeitraum der Entwicklung der CAM. Die Ergebnisse dieser Arbeit bringen wertvolle Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Genexpression Angiogenese-assoziiierter und immunmodulierender Faktoren in der CAM. Zudem konnte gezeigt werden, dass das CAM-Assay genutzt werden kann, um Genexpressionsveränderungen, die durch Strahlung verursacht werden, zu detektieren. Diese gewonnenen Erkenntnisse werden im Folgenden diskutiert, ehe abschließend ein Blick auf die Stärken und Schwächen der hier etablierten Methodik geworfen wird.

5.1 Genexpression in der nativen CAM

Die Entstehung der CAM ist in allen ihren Entwicklungsphasen hochdynamisch. Als embryonales Forschungsmodell konnte sie sich vor allem aufgrund eines dichten und sich rasch entwickelnden kapillären Netzwerks für *in vivo* Studien durchsetzen, um die pro- oder antiangiogenen Eigenschaften verschiedener Faktoren, Materialien oder Gewebe zu untersuchen (143). Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen der Gene VEGF-A, HIF-1 α , TGF- β , MMP13 sowie des NOS2 über den Zeitraum von EDD 6 bis 14 und die Expressionsanalysen mit den RT² Profiler qPCR Arrays an EDD 10, 12 und 14 unterstreichen die Dynamik der sich entwickelnden CAM und geben einen Überblick über die Expressionsprofile wichtiger Angiogenese-assoziiierter Faktoren und Immunmodulatoren.

5.1.1 Genexpression Angiogenese-assoziiierter Faktoren in der CAM

Einen Überblick über diese Dynamik geben die Genexpressionsanalysen der unbehandelten CAM mithilfe der RT² Profiler qPCR Arrays (vergleiche Kapitel 4.2.1). Von 82 auf den Arrays untersuchten Angiogenese-assoziierten Genen waren es 16 Gene, die an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 signifikant verändert exprimiert waren. Vergleicht man den EDD 14 mit EDD 12, so sind es 19 Gene, die signifikant verändert

exprimiert waren. Der Vergleich von EDD 14 mit EDD 10 brachte 25 Gene hervor, die signifikant verändert exprimiert waren. Der Beobachtungszeitraum, in dem die Genexpressionsanalysen mit den Arrays durchgeführt wurden, fällt zusammen mit dem Ende der Phase der Initiierung und Entwicklung der CAM von EDD 4/5 bis 12 sowie dem Stadium der Expansion und der Differenzierung von EDD 13 bis 18 (9). Die Daten der Arrays lassen zwischen diesen beiden Phasen einen Umbruch auf der Genexpressionsebene vermuten. Von den 16 Genen, welche an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 signifikant verändert exprimiert wurden, waren zwölf Gene vermehrt exprimiert. Lediglich vier der Gene waren vermindert exprimiert. Das Verhältnis von Zu- und Abnahme der Genexpression in dem Array des EDD 14 verglichen mit EDD 12 zeigte hingegen einen umgekehrten Trend. Dort waren drei Gene signifikant vermehrt, hingegen 16 Gene signifikant vermindert exprimiert. Während also zum Zweck der Initiierung und der Entwicklung der CAM vermehrt Angiogenese-assoziierte Gene exprimiert werden, scheint zum Stadium der Expansion und Differenzierung hin eine Vielzahl Angiogenese-assoziiierter Faktoren herunterreguliert zu werden. Dieser Bruch zeigt sich auch für die Angiogenese-assoziierten Faktoren VEGF-A und HIF-1 α , deren Expression im Einzelnen aufgeschlüsselt wurde. Die beiden Faktoren wurden nach EDD 11 bzw. 12 zu EDD 14 hin vermindert exprimiert. Auf der kleinsten vaskulären Ebene, also der Formation des kapillären Netzwerkes, sind es zwei der drei Stadien, die der Versuchsaufbau abdeckt, nämlich die Vergrößerung des Netzwerkes durch mikrovaskuläres Wachstum von EDD 7 bis 11 sowie die Ausdehnung ohne nennenswerte Komplexitätssteigerung von EDD 12 bis 13 (23, 26, 27). Der eben beschriebene Umbruch spiegelt sich auch hier wider. An EDD 12 ist das kapilläre Wachstum, wenngleich ohne Komplexitätssteigerung, im vollen Gange. Die Gewichtung zwischen Zu- und Abnahme der Expression Angiogenese-assoziiierter Gene lag mit 12 zu vier klar auf Seiten der Genexpressionszunahme. Nach Abschluss der Bildung des kapillären Netzwerkes, also an EDD 14, verschiebt sich diese Gewichtung mit 16 zu drei in Richtung Genexpressionsabnahme, sodass das Ende des kapillären Wachstums auch auf Genexpressionsebene ersichtlich ist. Diese Annahme ist dadurch bestärkt, dass mehr Angiogenese-assoziierte Gene, unabhängig vom Signifikanzniveau, den Trend dazu zeigten, zu EDD 12 hin vermehrt und zu EDD 14 hin vermindert exprimiert zu werden. So konnte gezeigt werden, dass 33 Angiogenese-assoziierte Faktoren von EDD 10 zu EDD 12 hin vermehrt und von EDD 12 zu EDD 14 hin vermindert exprimiert vorlagen. Ein umgekehrter Trend konnte bei lediglich 12 Genen festgestellt werden. Gut nach-

vollziehbar wird dieser Trend beispielsweise für den VEGFR1 und 2. Als wichtige Rezeptoren der VEGFs sind sie verantwortlich für die Proliferation und Migration von Endothelzellen (58). Sie gehören beide zur Gruppe derjenigen Gene, die von EDD 10 zu EDD 12 hin vermehrt und von EDD 12 zu EDD 14 hin vermindert exprimiert wurden. Da zur Bildung des kapillären Netzwerkes insbesondere Endothelzellen eine große Bedeutung einnehmen, erscheint die Beobachtung stimmig, dass beide Rezeptoren zum Ende des kapillären Wachstums hin, also zu EDD 14, vermindert exprimiert werden.

Passend zu den Beobachtungen der Expressionszunahme Angiogenese-assoziiierter Gene in den Phasen der Initiierung und der Entwicklung der CAM sowie des kapillären Wachstums konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das VEGF-A, welches als eines der Hauptakteure im Prozess der Angiogenese gilt, zwischen den EDD 7 und 11, verglichen mit EDD 6, vermehrt exprimiert wurde, siehe Kapitel 4.1.1 (51). Dabei war die Expression des Gens an EDD 7 um das in etwa 7-fache und an EDD 11 um das in etwa 6-fache, verglichen mit EDD 6, erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression zu EDD 14 hin abnahm. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Untersuchungen von Makanya et al. (9) und Marinaccio et al. (108), die ebenfalls einen Abfall der Genexpression des VEGF-A zu EDD 14 bzw. EDD 15 hin beobachten konnten. Die Untersuchungen von Makanya et. al unterschieden sich dahingehend, dass der EDD 8 als Referenzpunkt verwendet wurde. Zudem stellten die Forschenden die Expression über den EDD 14 hinaus dar. So konnten sie in ihren Untersuchungen eine Abnahme der VEGF-A Expression zu EDD 15 hin beobachten, während ein weiteres Maximum an EDD 20 erreicht wurde. In den Untersuchungen von Marinaccio et al. hingegen diente der EDD 18 als Referenzpunkt. Dort brachten die Untersuchungen ein Maximum der VEGF-A Expression an EDD 7 hervor, auf welches eine kontinuierliche Genexpressionsabnahme hin zu EDD 14 beobachtet werden konnte.

Als weiterer wichtiger Angiogenesefaktor gilt das HIF-1 α (51). Und auch bei diesem Gen ließ sich in den hier dargelegten Untersuchungen eine dem VEGF-A ähnliche Beobachtung machen, nämlich eine gesteigerte Expression in der CAM von EDD 7 bis 12 im Vergleich zur Expression an EDD 6. Dabei war ein Expressionsmaximum des HIF-1 α an EDD 7 und ein Expressionsminimum an EDD 14 zu verzeichnen. Die durchgeführten Arrays zeigten passend dazu, dass das HIF-1 α an EDD 12 im Vergleich zu EDD 10 und an EDD 14 im Vergleich zu EDD 12 vermindert exprimiert war. Ebenfalls ähnlich zum VEGF-A decken sich auch diese Beobachtungen mit den

Untersuchungen von Makanya et al. (9). Dort konnte für das HIF-1 α ein Expressionsmaximum an EDD 7 gefolgt von einer stetigen Abnahme bis zu einem Minimum an EDD 15 beobachtet werden. Von EDD 15 an stieg die Expression erneut bis EDD 20 an. Dabei war die Expression des Gens an EDD 18 im Vergleich zu EDD 8 erhöht. Diesen erneuten Anstieg des HIF-1 α begründen die Forschenden mit dem sogenannten *Internal Pipping* an EDD 18. Dabei durchsticht der Embryo die inneren Eimembranen, um mit dem Schnabel in die Luftkammer zu gelangen und die Lungen zu ventilieren. Als Folge daraus setzt der Lungenkreislauf ein und der Kreislauf in der CAM verliert an Bedeutung. Dies führe zu einer Hypoxie in der CAM, weshalb ein Anstieg des HIF-1 α , als sensitiver Marker für die Sauerstoffsättigung, folgt (9). Von diesen beiden Tendenzen abweichend konnten Marinaccio et al. in ihren Untersuchungen eine für das HIF-1 α insgesamt verminderte Genexpression an den EDD 7, 12 und 14 im Vergleich zu EDD 18 feststellen (108). Diese eher abweichende Tendenz könnte mit der Wahl der Kontrollgruppe an EDD 18 zusammenhängen. Ausgehend davon, dass an EDD 18 das *Internal Pipping* stattfindet, scheint gerade dieser EDD aufgrund des damit in Gang gesetzten veränderten Blutkreislaufs und der damit einher gehenden Dynamik ein schwieriger Referenzpunkt zu sein.

Ein weiterer Wachstumsfaktor, dessen Genexpression im Hinblick auf die Angiogenese der CAM und das kapilläre Wachstum in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war das TGF- β . Dieser wurde bisher in der CAM noch nicht quantifiziert. Bereits in Kapitel 2.2.7 umschrieben, ist dessen Rolle im Rahmen der Angiogenese vielfältig, da es diese sowohl fördern als auch hemmen kann (97, 98, 144). Die Beobachtung, dass das TGF- β 1 nach Aufbringung auf die CAM an EDD 9 in früheren Untersuchungen zu einer Zunahme der Arteriolen und Venolen sowie zu kapillärem Wachstum und erhöhter Endothelzellichte führen konnte, macht diesen Wachstumsfaktor zu einem interessanten Ziel (110). In den hier durchgeführten Untersuchungen war das TGF- β im Vergleich zu EDD 6 zwischen EDD 7 und 14 leicht erhöht exprimiert, jedoch an keinem EDD signifikant. Für das Gen konnte, auch aufgrund des fehlenden Signifikanzniveaus, kein klarer Trend bezüglich Zu- und Abnahme der Genexpression aufgeschlüsselt werden. Dadurch bleibt ein möglicher regulatorischer Einfluss des TGF- β auf die Endothelzellen in Richtung Förderung der Proliferation und Migration und damit auch die Beteiligung an der Angiogenese der sich entwickelnden CAM weiterhin fraglich.

5.1.2 Genexpression immunmodulierender Faktoren in der CAM

Gleichermaßen interessant für weitergehende Untersuchungen mit dem CAM Assay sind nicht nur Faktoren, die einen Einfluss auf die Angiogenese nehmen, sondern auch die Faktoren, die auf eine Immunantwort des embryonalen Systems hindeuten. Denkbare Untersuchungen, die von der Messung einer möglichen Immunantwort profitieren könnten, wären beispielsweise mögliche Biokompatibilitätsanalysen eines auf die CAM aufgelegten Fremdkörpers. Der sich entwickelnde Hühnerembryo ist, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, in der gesamten Zeit der Bebrütung nicht vollends immunkompetent (31). Dennoch gibt es einige wenige zelluläre Mechanismen der angeborenen Immunabwehr, die bereits untersucht und detektiert werden konnten. Im Hinblick auf die CAM waren dies vor allem embryonale Makrophagen. Diese gelten als die Hauptquelle des MMP13 im Hühnerembryo (39). Zudem konnte gezeigt werden, dass diese nach Kontakt mit Lipopolysacchariden und Interferon-gamma, ähnlich zu humanen Makrophagen, eine erhöhte NOS2 Aktivität aufwiesen (41). Sowohl das MMP13 als auch das NOS2 bieten dementsprechend ggf. die Möglichkeit, eine Immunantwort in der CAM zu bemessen. Folglich wurde in den hier dargelegten Untersuchungen die Genexpression beider Immunmodulatoren zwischen EDD 6 und 14 gemessen.

Das MMP13 war an EDD 6 noch nicht exprimiert und erst ab EDD 7 messbar, sodass alle weiteren EDDs mit EDD 7 verglichen wurden. Es zeigte sich, dass die Expression des MMP13 bis EDD 9 auf einem geringen Niveau blieb, ehe eine starke Expressionszunahme zu EDD10 hin beobachtet werden konnte. Von EDD 10 an stieg die Expression bis zu einem Maximum an EDD 12 weiter an, ehe zu EDD 13 eine starke Abnahme der Expression festgestellt werden konnte. Auch an EDD 14 blieb die Expression auf einem niedrigen Niveau. Interessanterweise zeichnet sich der bereits im vorherigen beobachtete Bruch auf Genexpressionsebene zwischen EDD 12 und 14, also zwischen dem Stadium der Initiierung und Entwicklung der CAM (EDD 4/5 bis 12) und dem Stadium der Expansion und Differenzierung (EDD 13 bis 18), auch für das MMP13 ab. Die Tatsache, dass die Expression des MMP13 erst an EDD7 messbar war, könnte darauf hindeuten, dass embryonale Makrophagen erst an EDD 10 in die CAM einwandern. Die Tatsache, dass die Genexpression des MMP13 der Genexpression der Angiogenese-assoziierten Faktoren der Arrays gleicht, könnte wiederum dafür sprechen, dass das MMP13 auch bei der Angiogenese in der CAM eine Rolle spie-

len könnte. Ferner lässt sich vermuten, dass möglicherweise embryonale Makrophagen nicht die einzigen Zellen sind, die das MMP13 exprimieren. Gleichmaßen ist jedoch auch denkbar, dass die embryonalen Makrophagen mithilfe des MMP13 direkt in die Angiogenese eingreifen, beispielsweise durch direkte Interaktion mit den Kapillarsprossen. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass das gezielte Ausschalten embryonaler Makrophagen in der CAM mit einer anti-angiogenen Reaktion einherging (42). Eine bedeutende Rolle des MMP13 in der sprossenden Angiogenese durch Sezernierung durch die *endothelial tip cells* und proteolytischem Abbau der EZM ist im humanen System bekannt (61). Folglich wäre es weiterführend interessant per immunhistochemischer Färbung zu prüfen, welche Zellen in der nativen CAM an EDD 10, 11 oder 12 MMP13-positiv sind, um die Rolle des MMP13 sowohl im Hinblick auf eine mögliche Einwanderung embryonaler Makrophagen als auch eine mögliche Beteiligung an der Angiogenese der CAM zu klären.

Für die Genexpression des NOS2, als zweiter der eben erwähnten Immunmodulatoren, zeichnete sich kein klarer Trend ab. Das Expressionsniveau von NOS2 war im Vergleich der untersuchten EDDs nicht wesentlich verändert und an keinem EDD konnte ein signifikanter Expressionsunterschied im Vergleich zu EDD 6 beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass das NOS2 über alle EDD hinweg auf einem konstanten Niveau exprimiert wird. Wie bereits erwähnt, lässt das NOS2 im Hühnerembryo ggf. Rückschlüsse auf die Phagozytose-Aktivitäten von embryonalen Makrophagen zu (41). Im Hinblick auf die hier dargelegten Daten ließe sich daraus schließen, dass zu keinem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraums eine signifikant erhöhte Phagozytose-Aktivität vorhanden war. An dieser Stelle würde sich eine immunhistochemische Färbung anbieten, um zu detektieren, ob es tatsächlich embryonale Makrophagen sind, die das NOS2 in der CAM exprimieren. Eine erhöhte Phagozytose-Aktivität dieser Makrophagen wäre nach Auflegen eines Fremdkörpers auf die CAM zu erwarten. Ferner könnte untersucht werden, ob ein solches Aufbringen eines Fremdkörpers mit einer erhöhten NOS2-Genexpression einhergeht und ab welchem EDD dies der Fall ist.

5.2 Strahlenwirkung auf die Genexpression wichtiger Schlüsselfaktoren der Angiogenese in der CAM

Wenngleich die Strahlentherapie seit Jahrzehnten eine der etabliertesten Therapieoptionen zur Behandlung bösartiger Neubildungen ist, ist wenig über die Auswirkung der

Strahlung auf die detaillierte Genexpression wichtiger Angiogenese-assoziiierter Faktoren bekannt. Die einfache Zugänglichkeit auf das dichte kapilläre Netzwerk der CAM ermöglicht es, Strahlenwirkungen schnell und unmittelbar zu detektieren. So konnten in den durchgeführten Untersuchungen bei fünf Genen sechs Stunden nach Bestrahlung der nativen CAM sowohl an EDD 10, 12 und 14, eine signifikante Genexpressionsreduktion um das mindestens 1,5-fache in der Gruppe der bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden. Dies waren die Angiogenese-assoziierten Faktoren VEGFR2, TIE1, TEK, TBX1 und das VE-Cadherin. Auf diese fünf Gene, die unabhängig vom EDD der Bestrahlung gleichförmig in der CAM reguliert waren, soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Auch wird ein Blick auf die Erkenntnisse geworfen, die im Gesamten durch die Durchführung der Arrays nach Bestrahlung der CAM gewonnen werden konnten.

Für all diese Faktoren gestaltet sich der Vergleich mit der vorhandenen Literatur insofern schwierig, als dass es keine Vergleichsstudien zur Detektion von Genexpressionsveränderungen nach Anwendung ionisierender Strahlung auf die CAM gibt. Die Methodik dieser Arbeit ist neu und wurde erstmalig durchgeführt. So lassen sich die hier erzielten Ergebnisse lediglich mit verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien mit anderen Geweben und Zelllinien vergleichen.

Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen konnten Gil Marques et al. (134) und Filipa Marques et al. (135) in ihren *in vivo* Untersuchungen zeigen, dass niedrige Strahlendosen von <0,8 Gy in peritumoralem Gewebe acht Wochen und 0,5 Gy in Endothelzellen von Zebrafischlarven 48 Stunden nach Bestrahlung zu einer gesteigerten Genexpression des VEGFR2 führten. Der Vergleich der gewonnenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen von Gil Marques et al. (134) und Filipa Marques et al. (135) sowie den in dieser Arbeit getätigten Beobachtungen legt nahe, dass sowohl die Strahlendosis als auch der Untersuchungszeitpunkt Auswirkungen auf die Genexpression haben. Da in allen Untersuchungen verschiedene Gewebsarten zugrunde gelegen haben, bleibt auch die Frage nach einem möglichen Einfluss der verschiedenen Gewebe auf die Genexpression offen. Prolongierte Untersuchungsintervalle nach Bestrahlung der CAM mit verschiedenen Strahlendosen könnten Aufschluss darüber geben, ob niedrige Strahlendosen auch in der CAM zu einer Genexpressionszunahme des VEGFR2 führen. Gleichmaßen könnte überprüft werden, ob spätere Messzeitpunkte ausschlaggebend für die Zunahme der Genexpression, unabhängig der Strahlendosis,

sind. Diese Frage ist in vielerlei Hinsicht interessant, da im Gesamten beobachtet werden konnte, dass zu dem gewählten Untersuchungszeitpunkt sechs Stunden nach Bestrahlung überwiegend Genexpressionsabnahmen festgestellt werden konnten. Denkbar wäre, dass Reparaturmechanismen sechs Stunden nach Bestrahlung noch nicht greifen und zu späteren Zeitpunkten eine erhöhte Genexpression hervorbringen. Diese Annahme wird gestützt von den Beobachtungen, die Lee et al. (136) machten. In ihren *in vivo* Untersuchungen konnten die Autoren genau wie in den hier dargelegten Ergebnissen feststellen, dass die Genexpression des TEK vier und acht Stunden nach Bestrahlung mit γ -Strahlung von 10 Gy im Hirngewebe von Ratten vermindert war. Nach 24 Stunden näherte sich die Genexpression wieder der Genexpression der Kontrollgruppe an. Dies könnte mit etwaigen Reparaturmechanismen korrelieren. Im Übrigen konnten die Autoren feststellen, dass verringerte Genexpressionen mit verringerten Proteinexpressionen einhergingen. Im Hinblick auf das VE-Cadherin konnten Kabacik und Raj (139) sowie Kouam et al. (141) in ihren *in vitro* Untersuchungen, konträr zu der hier beobachteten Genexpressionsabnahme, eine gesteigerte mRNA-Expression des VE-Cadherins nach zwölf und 24 Stunden sowie 7 Tagen nach Bestrahlung mit 0,5, 2 und 10 Gy bzw. 2 und 4 Gy in endothelialen Zelllinien feststellen. Diese ging interessanterweise, anders als bei Lee et. al (136) beobachtet, nicht mit einer gesteigerten Proteinexpression einher. Dies erklärten die Autoren mit einer Zunahme des ADAM10, welches in seiner Funktion als Metalloproteinase das VE-Cadherin abbaut (140). Dies verdeutlicht, dass nicht zwangsläufig aus einer veränderten Genexpression auch auf eine gleichermaßen veränderte Proteinexpression geschlossen werden kann. Die Beobachtungen rund um das VE-Cadherin werfen gleich zwei Fragen auf. Zum einen ist interessant, ob die Genexpressionsunterschiede nach Bestrahlung dadurch zu erklären sind, dass die Untersuchungen von Kabacik und Raj *in vitro*, das CAM-Assay hingegen ein *in vivo* Versuchsaufbau ist. Zum anderen ist der Blick auf die Proteinexpression der hier untersuchten Faktoren von großem Interesse. Mit dem VEGFR2, dem TIE1, dem TEK, dem VE-Cadherin sowie dem TBX1 handelt es sich um gleich fünf wichtige Angiogenese-assoziierte Faktoren. Auf Genexpressionsebene deutet die Reduktion dieser Faktoren auf einen anti-angiogenen Effekt hin. Inwiefern sich dieser Effekt jedoch auf die Proteinexpression überträgt und ob auch in der CAM eine positive Beziehung zwischen Genexpression und Proteinexpression vorhanden ist, ist ein weiterer Aspekt, der überprüft werden sollte. Um sowohl die Proteinexpression als auch die biologische Wirkung der Strahlung aufzuschlüsseln, könnten in prolongierten Untersuchungsintervallen nach Bestrahlung der CAM mit verschiedenen

Strahlendosen Messungen der Proteinexpression, beispielsweise per Western Blot, angeschlossen werden. Zudem wäre es auch denkbar, vaskuläre Analysen anzuschließen, beispielsweise eine mikroskopische Quantifizierung der Gefäßanzahl, der Gefäßverzweigungen, der Gefäßdicke sowie eine Detektion von Blutungen, wie sie im CAM-Gewebe dank der guten Zugänglichkeit der Membran auf jeden Fall möglich wären.

Zusätzlich zu den Überlegungen, inwiefern Strahlungs-dosis und Zeiträume der Untersuchung Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression nehmen, konnte die Durchführung der Arrays deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen EDD aufzeigen. Vor allem an EDD 12 konnten die Arrays nach Bestrahlung deutlich mehr Veränderungen in der Genexpression aufzeigen als an EDD 10 und 14. So war an EDD 12 die Expression von insgesamt 43 Genen signifikant verändert. An EDD 10 waren lediglich neun, an EDD 14 lediglich 19 Gene reguliert. Damit präsentiert sich der EDD 12 als wichtiger Schlüsseltag, an dem eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen im Hinblick auf die Angiogenese ablaufen und der besonders sensitiv auf Strahlung reagiert. Diese Erkenntnis sollte vor allem bei zukünftigen Untersuchungen in der CAM Berücksichtigung finden. Da nicht davon auszugehen ist, dass alle Eier synchron in ihrer Entwicklung sind, birgt dieser EDD sowohl für geplante Interventionen und Behandlungen an der CAM als auch für Quantifizierungen jeglicher Art Risiken. Bei geplanten Interventionen an der CAM sind ungewollte Schwankungen dadurch denkbar, dass die Intervention an einigen Eiern vor und an anderen Eiern wiederum nach den beobachteten regulatorischen Mechanismen abläuft. Gleiches gilt für mögliche Quantifizierungen, um weitere Erkenntnisse im Hinblick auf Genexpression oder Proteinexpression zu gewinnen. Auch hier sollte ein EDD gewählt werden, der mit weniger aktiven regulatorischen Prozessen einhergeht.

Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die hier dargelegte Methodik aus Bestrahlung der CAM und die Beobachtung der Genexpressionsveränderungen ein enormes Potenzial hat und viel Spielraum für Erweiterungen bietet. Diese Erweiterungen sind dabei nicht nur auf die oben aufgeführten und ergänzenden Methodiken wie Western Blot Analysen oder Mikroskopie limitiert. Das Verständnis darüber, an welchem Tag welche Genexpressionsveränderungen in der nativen CAM überwiegen, öffnet die Tür für eine ganze Bandbreite onkologischer Untersuchungen. So könnten mithilfe des CAM-Assays wichtige Informationen darüber gewonnen werden, wie Tumore, die in

der CAM wachsen, auf die Strahlung reagieren. Dadurch, dass die CAM so gut zugänglich ist, könnten nicht nur Proben des Tumors selbst, sondern gleichermaßen des umliegenden Gewebes geerntet werden. Des Weiteren ist eine longitudinale Beobachtung der Gefäßentwicklung – wenn auch in den beschränkten Zeiträumen des CAM-Assays – möglich. Dadurch wäre es möglich, wichtige und neue Erkenntnisse über die Auswirkung von Strahlung auf die Mikroumgebung von Tumoren zu gewinnen und therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu entdecken.

5.3 Methodische Überlegungen und Limitationen

5.3.1 Stärken und Schwächen der verwendeten Methode

Die in dieser Arbeit etablierte Methode aus RNA-Entnahme, cDNA-Synthese und anschließender RT-qPCR erscheint im Ganzen, unter strenger Einhaltung der Protokolle, als eine vielversprechende Möglichkeit, die Genexpression einzelner wichtiger Angiogenese-assoziiierter Faktoren und Immunmodulatoren in der Entwicklung der CAM für verschiedene EDD im Vergleich zu einer Kontrollgruppe darzustellen. Auch die Erweiterung der Methodik durch Addition der Strahlentherapie und Aufschlüsselung der Genexpressionsänderungen per RT² Profiler qPCR Array konnte vielversprechende Einblicke in die Wirkung ionisierender Strahlung auf das im Strahlungsfeld liegende Gewebe geben.

Dabei stellten sich im Laufe der Entwicklung der Methodik einzelne Limitationen aber auch Vorteile heraus. Die Limitationen sind vor allem darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem CAM-Assay um ein hochdynamisches embryonales System handelt. Das birgt im Gegensatz zu klassischen *in vitro* Zellkultursystemen zwar den Vorteil, dass die Untersuchungen in einem komplexen Organismus stattfinden und somit auch zu Teilen aussagekräftiger sind. Jedoch ist das CAM-Assay als ein solches embryonales System besonders sensibel und hochempfindlich gegenüber äußeren Umwelteinflüssen. Bereits minimale Unterschiede in den Bebrütungsbedingungen wie Temperatur oder relative Luftfeuchtigkeit sind dazu in der Lage, einen immensen Einfluss auf den Entwicklungsstatus des Embryos und der CAM zu nehmen (145). Eben dieser Entwicklungsstatus des Embryos stellt eine weitere Limitation dar. Der gesamte Entwicklungsstatus der einzelnen Eier ist zu keinem Zeitpunkt vollends synchronisierbar. Das liegt darin begründet, dass der Start der Bebrütung kein exakt definierbarer Zeitpunkt ist, da durch die Lieferung unklar bleibt, wann welches Ei gelegt wurde und wann sie

vom Lieferanten eingesammelt wurden. Es ist davon auszugehen, dass jedes Ei zu Beginn des Versuchsaufbaus bereits, wenngleich minimal, unterschiedlich weit in seiner Entwicklung ist. Diese leichten Entwicklungsunterschiede spiegeln sich in einem so dynamischen System wie der CAM auch direkt in Unterschieden in der vaskulären Entwicklung wider, denen sicherlich auch Genexpressionsunterschiede zugrunde liegen. Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt werden sollte, ist der, dass es sich um keine genetisch identischen Individuen handelt. Dies ist einerseits insofern von Vorteil, als dass dies eine Parallele zu Untersuchungen an heterogenen Patientenpopulationen darstellt. Gleichzeitig führen beide Aspekte jedoch zu größeren interindividuellen Genexpressionsunterschieden, die zu größeren Standardabweichungen in den Analysen führen, da die Entnahme von Gewebe in der CAM nur einmal pro Ei und nicht longitudinal mehrmals in einem Individuum durchgeführt werden kann. Klarer Vorteil gegenüber Versuchen mit Nagetieren jedoch ist, dass das CAM-Assay in der Lage ist, das größtmögliche Tierwohl bei dennoch nötiger Forschung an lebenden Organismen miteinander in Verbindung zu bringen. Dabei werden die 3R-Regeln gewahrt (8).

Um mögliche Schwankungen so gering wie möglich zu halten, gibt es einige Fehlerquellen und Eckpunkte in der Durchführung der Methodik, die unbedingt beachtet werden sollten. So ist eine penible Planung der Versuchsreihen unausweichlich. Das gilt unter anderem für den Start der Bebrütung der Eier, wie auch die Entnahmezeitpunkte und die unmittelbare Weiterverarbeitung der entnommenen Proben. Ferner zeigte sich, dass es nicht nur sinnvoll erscheint, die statistisch wichtige Größe von mindestens drei unterschiedlichen Proben pro EDD einzuhalten, sondern ebenso jeweils mindestens drei Proben aus drei unterschiedlichen Durchläufen einzubeziehen. Dies ermöglicht ein aussagekräftiges Ergebnis, da die Ergebnisse eines einzelnen Durchlaufs sich aufgrund der vorherig genannten Limitationen und den daraus resultierenden Schwankungen zwischen verschiedenen Durchläufen nicht dazu eignen, generalisierte Aussagen über die Genexpression einzelner Gene zu treffen. Ebenso gilt, wie bereits in Abschnitt 3.2.3 erwähnt, zu beachten, dass am Ende der cDNA-Synthesierung eine Aliquotierung der Proben vorgenommen werden sollte. Dies verhindert, dass einzelne Proben mehrfach aufgetaut und erneut bei -20°C eingefroren werden. Ein solches Vorgehen könnte Einfluss auf die cDNA-Qualität und die darauffolgenden Ergebnisse der RT-qPCR nehmen.

5.3.2 Offene Fragen und Überlegungen zur Erweiterung der Methodik

Die Genexpressionsanalyse einzelner Angiogenese-assoziiierter Faktoren und Immunmodulatoren in der CAM hilft dabei, ein erweitertes Verständnis der Entwicklung der CAM als solches zu schaffen. Diese Methodik ist vielversprechend, wenn pro- oder antiangiogene Reaktionen verschiedener Substanzen, Materialien und Präparate untersucht werden sollen. Ein tiefergehendes Verständnis der Genexpression einzelner Angiogenese-assoziiierter Faktoren wie dem VEGF-A gibt zudem Aufschluss darüber, zu welchem Zeitpunkt verschiedene Fremdkörper, Biomaterialien oder Tumore auf die CAM aufgelegt werden sollten, um bestimmte Fragestellungen zu untersuchen. Dabei muss immer auch bedacht werden, dass die Genexpression als solches nicht mit der letztendlichen Proteinexpression gleichzusetzen ist. Gleichmaßen kann auch eine genaue Aufschlüsselung der Proteinexpression von der eigentlichen biologischen Wirkung abweichen. Demnach sollten Genexpressionsuntersuchungen immer auch mit Analysen der Proteinexpression und Untersuchungen des biologischen Effekts ergänzt werden. So wären die Aufschlüsselung der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren auf Proteinebene per Western Blot, Messungen der Gefäßdichte und -verzweigung wie auch Permeabilitätsassays denkbare Fortführungen der Methodik. Zudem interessant ist die Fragestellung, durch welche Zellen genau die einzelnen Faktoren exprimiert werden. Hierzu würde es sich anbieten, immunhistologische Färbungen vorzunehmen oder mittels sc-RNA-Sequenzierung oder *spatial transcriptomics* die Genexpressionsunterschiede in der CAM genauer aufzuschlüsseln.

6 Zusammenfassung

In der biomedizinischen Forschung hat sich das CAM-Assay als eine Brücke zwischen *in vitro* Zellkultursystemen und klassischen *in vivo* Experimenten mit Nagetieren etabliert. Untersuchungen zur Angiogenese in Bezug auf das Metastasierungs- und Proliferationsverhalten von Tumoren oder auch die Biokompatibilität und pro- bzw. antiangiogenen Eigenschaften unterschiedlicher Materialien können mithilfe des CAM-Assays durchgeführt werden. In all diesen Forschungsfeldern ist ein tiefergreifendes Verständnis der angiogenen und immunologischen Entwicklung der CAM unerlässlich. Gerade das Genexpressionsverhalten wichtiger Schlüsselfaktoren der Angiogenese und Immunmodulatoren innerhalb dieser Entwicklung ist in seinen Details noch weitestgehend unerforscht.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Methodik – bestehend aus Probenentnahme, mRNA-Extraktion, cDNA-Synthese und anschließender RT-qPCR – konnte dahingehend wichtige Erkenntnisse zur Expression einzelner Angiogenese-assoziiierter Faktoren in der sich entwickelnden CAM hervorbringen. Es konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese in der CAM vor allem zwischen den EDD 10 und 14 hochdynamisch ist. Mit den durchgeführten RT² Profiler qPCR Arrays konnte ein Umbruch auf Genexpressionsebene zwischen der Phase der Initiierung und Entwicklung der CAM von EDD 4/5 bis 12 und dem Stadium der Expansion und Differenzierung von EDD 13 bis 18 festgestellt werden. Dieser Bruch war ebenfalls für das VEGF-A und das HIF-1 α ersichtlich. In diesem Zusammenhang zeichnete sich auch das Ende des kapillären Wachstums auf Genexpressionsebene ab. Außerdem konnten für eben diese Angiogenese-assoziierten Faktoren, das VEGF-A und das HIF-1 α , ähnliche Trends mit einer gesteigerten Genexpression von EDD 7 bis 11/12 beobachtet werden, die zu EDD 14 hin abflachten.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die etablierte Methodik auch für immunologische Fragestellungen ein hohes Potenzial hat. So konnten mit dem MMP13 und dem NOS2 zwei potenzielle Immunmodulatoren in der CAM quantifiziert werden. Insbesondere das MMP13 hat sich dabei als interessantes Target erwiesen. Dessen Expressionsverhalten deutet darauf hin, dass es an EDD 10 zu einer Einwanderung embryonaler Makrophagen in die CAM kommt. Außerdem zeigt sich, ähnlich den Angiogenese-assoziierten Faktoren, auch für das MMP13 ein starke Genexpressionsabnahme von EDD 12 auf EDD 14. So zeichnet sich eine mögliche Beteiligung der einwandernden

Makrophagen durch das MMP13 an der Gefäßneubildung in der CAM auf Genexpressionsebene ab.

Ferner konnten für das seit Jahrzehnten etablierte Verfahren der Strahlentherapie die unmittelbaren Strahlenwirkungen auf ein natives Gewebe und dessen Genexpression quantifiziert werden. Im Hinblick auf die CAM und dessen sich entwickelndes dichtes kapilläres Netzwerk konnte gezeigt werden, dass die angewendete Röntgenstrahlung über alle untersuchten EDD hinweg insbesondere mit Genexpressionsabnahmen wichtiger Angiogenese-assoziierten Faktoren sechs Stunden nach Bestrahlung einherging. Vor allem der Vergleich mit der vorhandenen Literatur legt dahingehend die Vermutung nahe, dass sowohl die Strahlendosis als auch der Zeitpunkt der Messungen maßgebende Faktoren für die Zu- oder Abnahme der Genexpression sind. Insbesondere der EDD 12 präsentierte sich als besonders empfindlicher Zeitpunkt für die Angiogenese in der CAM und reagierte sensitiv auf Strahlung, was in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden sollte. Da Eier in ihrer Entwicklung asynchron sein können, kann dies bei geplanten Interventionen und Quantifizierungen zu Schwankungen führen, sodass ein Zeitpunkt mit weniger aktiven regulatorischen Prozessen gewählt werden sollte, um konsistente Ergebnisse zu gewährleisten. Ferner konnten aus allen durchgeführten RT² qPCR Profiler Arrays mit dem VEGFR2, dem VE-Cadherin, dem TIE1 und TEK sowie dem TBX1 fünf durch die Strahlung gleichförmig regulierte Faktoren ausfindig gemacht werden. Allesamt waren diese sechs Stunden nach Bestrahlung um das mindestens 1,5-fache vermindert exprimiert.

Sowohl die grundlegende Methodik als auch die Erweiterung der Methodik um die Applikation ionisierender Strahlung auf das native CAM-Gewebe haben sich als überaus praktikabel erwiesen. Dabei birgt der Versuchsaufbau großen Spielraum für mögliche methodische Erweiterungen. So können der Aufschlüsselung der Genexpression nahtlos Untersuchungen der Proteinexpression per Western Blot oder Untersuchungen der biologischen Wirkung per mikroskopischer Quantifizierung der Gefäßanzahl, der Gefäßverzweigungen, der Gefäßdicke sowie eine Detektion von Blutungen angeschlossen werden. Auch zellspezifische Methodiken wie immunhistologische Färbungen, scRNA-Sequenzierung oder *spatial transcriptomics* können der Methodik folgen. Insbesondere für Fragestellungen, die sich mit der Auswirkung von Strahlung auf die tumorale Mikroumgebung und das native Gewebe beschäftigen, sollten das CAM-Assay und die hier beschriebene Methodik als praktikable und erfolgsversprechende Optionen in Erwägung gezogen werden.

7 Anhang

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AKT1	ANG	ANGPT1	ANGPT2	ANGPTL4	ANPEP	BAI3	CDH5	COL18A1	COL4A3	CSF3	CTGF
B	EDN1	EDNRA	EFNA2	EFNB2	EGF	ENG	EPAS1	EPHB2	ERBB2	F2	F3	FGF1
C	FGF2	FGF6	FGFR3	FIGF	FLT1	FN1	HGF	HIF1A	HFSE	ID1	IFNA3	IFNB
D	IFNG	IGF1	IL1B	IL6	IL8L1	ITGAV	RP11-290H9.2	JAG1	KDR	LECT1	LITAF	LOC422654
E	PGF	MARK14	MDK	MMP14	MMP2	MMP9	NOS3	NOTCH1	NRP1	NRP2	PDGFA	PDGFB
F	PECAM1	PLAU	PLG	PROK2	PTGS1	PTK2	S1PR1	SERPINB5	SERPINE2	SERPINF1	SPHK1	TBK1
G	TEK	TGFA	TGFB2	TGFB3	TGFB3	THBS1	THBS2	TIE1	TIMP2	TIMP3	VEGFA	VEGFC
H	ACTB	H6PD	HMB5	RPL4	UBC	GGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Abbildung 23: Plattenbelegung des RT² Profiler qPCR Arrays, *Chicken Angiogenesis*, PAGG-024ZA, Abbildung von QIAGEN®

Tabelle 25: Detaillierte Aufstellung der auf dem Array befindlichen Gene, passend zur Abbildung 23, exportiert von QIAGEN®

Position	U-nigene	Refseq	Symbol	Description
A01	Gga.3875	NM_205055	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A02	Gga.703	NM_205259	ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
A03	Gga.9471	NM_001199447	ANGPT1	Angiopoietin 1
A04	Gga.3259	NM_204817	ANGPT2	Angiopoietin 2
A05	N/A	XM_001232283	ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
A06	Gga.48091	NM_204861	ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)
A07	Gga.54866	XM_419892	BAI3	Brain-specific angiogenesis inhibitor 3
A08	Gga.5171	NM_204227	CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)
A09	Gga.22843	NM_204164	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1
A10	Gga.55520	XM_001234729	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
A11	Gga.712	NM_205279	CSF3	Mature cMGF
A12	Gga.4051	NM_204274	CTGF	Connective tissue growth factor
B01	N/A	XM_418943	EDN1	Endothelin 1
B02	Gga.137	NM_204119	EDNRA	Endothelin receptor type A
B03	Gga.2416	NM_204983	EFNA2	Ephrin-A2
B04	Gga.357	NM_204824	EFNB2	Ephrin-B2
B05	Gga.17682	NM_001001292	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
B06	Gga.31780	NM_001080887	ENG	Endoglin
B07	Gga.43355	NM_204807	EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1
B08	Gga.3405	NM_206951	EPHB2	EPH receptor B2
B09	Gga.23927	NM_001044661	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
B10	Gga.4117	NM_204605	F2	Coagulation factor II (thrombin)

Anhang

Position	U-nigene	Refseq	Symbol	Description
B11	N/A	XM_426640	F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
B12	Gga.648	NM_205180	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
C01	Gga.39646	NM_205433	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
C02	N/A	XM_001232070	FGF6	Fibroblast growth factor 6
C03	Gga.14066	NM_205509	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
C04	Gga.3219	NM_204568	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
C05	Gga.150	NM_204252	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
C06	Gga.3994	NM_001198712	FN1	Fibronectin 1
C07	Gga.28385	NM_001030370	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
C08	Gga.4933	NM_204297	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
C09	Gga.950	NM_204167	HPSE	Heparanase
C10	Gga.892	NM_204590	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
C11	Gga.801	NM_205427	IFNA3	Interferon
C12	Gga.22865	NM_001024836	IFNB	Interferon beta
D01	Gga.916	NM_205149	IFNG	Interferon, gamma
D02	Gga.850	NM_001004384	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
D03	Gga.19	NM_204524	IL1B	Interleukin 1, beta
D04	Gga.2769	NM_204628	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D05	Gga.512	NM_205018	IL8L1	Interleukin 8
D06	Gga.815	NM_205439	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
D07	Gga.1039	NM_204315	RP11-290H9.2	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
D08	Gga.53615	XM_415035	JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)
D09	Gga.807	NM_001004368	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
D10	Gga.4723	NM_204810	LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1
D11	Gga.3383	NM_204267	LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor
D12	Gga.12407	XM_420608	LOC422654	Similar to K60 protein
E01	N/A	XM_001235058	PGF	Placenta growth factor-like
E02	Gga.48312	XM_001232615	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
E03	Gga.5002	NM_001113289	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
E04	N/A	XM_423918	MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
E05	Gga.3199	NM_204420	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
E06	Gga.48727	NM_204667	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
E07	N/A	XM_003640632	NOS3	Endothelial nitric oxide synthase 3
E08	Gga.54229	XM_415420	NOTCH1	Notch 1
E09	Gga.4032	NM_204782	NRP1	Neuropilin 1
E10	Gga.49257	NM_204284	NRP2	Neuropilin 2
E11	Gga.3899	NM_204306	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide

Anhang

Position	U-nigene	Refseq	Symbol	Description
E12	Gga.71	NM_204270	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)
F01	Gga.39143	XM_001234535	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
F02	Gga.817	NM_205443	PLAU	Plasminogen activator, urokinase
F03	N/A	XM_419618	PLG	Plasminogen
F04	N/A	XM_001234924	PROK2	Prokineticin 2
F05	N/A	XM_425326	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
F06	Gga.15614	NM_205435	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
F07	Gga.13269	XM_004936550	S1PR1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1
F08	N/A	XM_418986	SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
F09	Gga.4105	NM_001083920	SERPINE2	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
F10	Gga.1180	NM_001257289	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
F11	N/A	XM_425374	SPHK1	Sphingosine kinase 1
F12	N/A	XM_001234619	TBX1	T-box 1
G01	N/A	XM_424944	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)
G02	Gga.20109	NM_001001614	TGFA	Transforming growth factor, alpha
G03	Gga.8797	XM_003640970	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
G04	Gga.42150	NM_205454	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
G05	Gga.143	NM_204246	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)
G06	Gga.10300	NM_001199453	THBS1	Thrombospondin 1
G07	Gga.797	NM_001001755	THBS2	Thrombospondin 2
G08	N/A	XM_422400	TIE1	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
G09	Gga.2965	NM_204298	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
G10	Gga.2827	NM_205487	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
G11	Gga.537	NM_001110355	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
G12	Gga.12347	XM_420532	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
H01	Gga.48207	NM_205518	ACTB	Actin, beta
H02	Gga.50291	XM_425746	H6PD	Hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)
H03	Gga.8480	XM_417846	HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
H04	Gga.4523	NM_001007479	RPL4	Ribosomal protein L4
H05	Gga.39142	XM_001234599	UBC	Ubiquitin C
H06	N/A	SA_00517	GGDC	Chicken Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Tabelle 26: Rohdaten des VEGF-A mit deskriptiver Statistik

Rohdaten VEGF-A, mittlere relative Expression (Fold Change) mit EDD 6 als Kontrollgruppe

EDD 7	EDD 8	EDD 9	EDD 10	EDD 11	EDD 12	EDD 13	EDD 14
2,56	2,63	2,68	7,59	3,49	1,33	1,46	1,92
7,13	4,64	3,01	5,34	6,03	5,30	2,23	1,58
12,31	5,10	4,65	5,56	8,10	3,66	2,04	1,52
11,14	2,18	4,07	4,77	7,85	2,02	2,76	1,57
10,57	3,01	2,25	3,20	8,62	2,68	0,63	0,85
3,71	6,72	3,88		10,19	5,37	1,94	3,84
5,04	4,91	5,02		3,57	1,21	2,13	2,07
4,99	5,80			4,11			2,74
				2,22			1,45
							3,36
							2,14
							2,78

Deskriptive Statistik VEGF-A

Probenanzahl	8	8	7	5	9	7	7	12
Minimum	2,56	2,18	2,25	3,20	2,22	1,21	0,63	0,85
Maximum	12,31	6,72	5,02	7,59	10,19	5,37	2,76	3,84
Bereich	9,74	4,55	2,77	4,39	7,98	4,16	2,13	2,99
Mittelwert	7,18	4,37	3,65	5,29	6,02	3,08	1,89	2,15
Standardabweichung	3,71	1,61	1,04	1,58	2,79	1,75	0,67	0,87

Tabelle 27: Rohdaten des MMP13 mit deskriptiver Statistik

Rohdaten MMP13, mittlere relative Expression (Fold Change) mit EDD 7 als Kontrollgruppe

EDD 8	EDD 9	EDD 10	EDD 11	EDD 12	EDD 13	EDD 14
0,39	1,59	6,27	3,09	1,72	1,10	0,76
0,75	0,64	5,22	7,74	7,14	2,48	6,57
0,56	0,64	11,39	17,04	15,57	2,36	5,08
0,30	1,31	5,77	13,14	21,94	1,96	0,63
1,01	0,80	12,61	7,02	9,56	3,24	1,69
0,61	1,18		10,07	12,80	5,10	4,92
0,93			11,86	12,16	2,92	2,22
0,41			9,03			2,20
			13,94			14,07
						3,70
						9,01
						6,81

**Rohdaten MMP13, mittlere relative Expression (Fold Change)
mit EDD 7 als Kontrollgruppe**

Deskriptive Statistik MMP13

Probenanzahl	8	6	5	9	7	7	12
Minimum	0,30	0,64	5,22	3,09	1,72	1,10	0,63
Maximum	1,01	1,59	12,61	17,04	21,94	5,10	14,07
Bereich	0,71	0,95	7,39	13,95	20,22	4,00	13,44
Mittelwert	0,62	1,03	8,25	10,33	11,56	2,74	4,80
Standardabweichung	0,26	0,39	3,47	4,19	6,40	1,25	3,92

Tabelle 28: Rohdaten des HIF-1 α mit deskriptiver Statistik

**Rohdaten HIF-1 α , mittlere relative Expression (Fold Change) mit EDD
6 als Kontrollgruppe**

EDD 7	EDD 8	EDD 9	EDD 10	EDD 11	EDD 12	EDD 13	EDD 14
1,95	1,40	1,57	1,39	0,54	0,19	0,35	0,49
2,12	1,75	1,44	1,74	1,09	1,04	0,95	0,40
1,73	1,30	1,76	1,63	1,20	1,44	0,55	0,35
1,26	0,69	1,30	1,74	1,05	2,13	1,07	0,51
1,72	0,65	1,08	2,13	1,29	1,26	1,63	0,85
1,77	1,88	2,00		1,42	1,47	0,43	1,20
2,37	1,92	1,88		0,96	1,76	0,77	0,94
2,16	1,25			1,22	0,95	1,02	0,87
				1,11			1,23
							0,91
							0,82
							0,96

Deskriptive Statistik HIF-1 α

Probenanzahl	8	8	7	5	9	8	8	12
Minimum	1,26	0,65	1,08	1,39	0,54	0,19	0,35	0,35
Maximum	2,37	1,92	2,00	2,13	1,42	2,13	1,63	1,23
Bereich	1,11	1,28	0,92	0,74	0,88	1,94	1,28	0,88
Mittelwert	1,89	1,36	1,58	1,73	1,10	1,28	0,85	0,79
Standardabweichung	0,34	0,50	0,33	0,27	0,25	0,58	0,42	0,29

Tabelle 29: Rohdaten des NOS2 mit deskriptiver Statistik

**Rohdaten NOS2, mittlere relative Expression (*Fold Change*) mit EDD
6 als Kontrollgruppe**

EDD 7	EDD 8	EDD 9	EDD 10	EDD 11	EDD 12	EDD 13	EDD 14
1,07	0,94	1,13	3,26	0,48	0,88	1,12	1,12
3,19	0,49	0,97	0,80	2,56	2,14	0,41	0,68
2,27	2,22	0,70	1,69	5,78	2,39	1,04	1,20
2,25	0,58		3,51	5,93	1,49	3,03	0,71
3,44	1,72			3,84	2,46	0,96	1,04
2,49	2,03			6,83	0,58	1,57	3,87
0,91				3,29			3,18
2,07				3,48			3,97
				1,46			4,80
							3,98
							4,01
							4,92

Deskriptive Statistik NOS2

Probenanzahl	8	6	3	4	9	6	6	12
Minimum	0,91	0,49	0,70	0,80	0,48	0,58	0,41	0,68
Maximum	3,45	2,22	1,13	3,52	6,83	2,46	3,03	4,92
Bereich	2,53	1,72	0,43	2,71	6,35	1,88	2,62	4,24
Mittelwert	2,21	1,33	0,94	2,32	3,74	1,66	1,36	2,79
Standardabweichung	0,89	0,75	0,22	1,29	2,12	0,80	0,90	1,69

Tabelle 30: Rohdaten des TGF- β mit deskriptiver Statistik

**Rohdaten TGF- β , mittlere relative Expression (*Fold Change*) mit EDD
6 als Kontrollgruppe**

EDD 7	EDD 8	EDD 9	EDD 10	EDD 11	EDD 12	EDD 13	EDD 14
3,94	1,09	1,71	1,76	0,66	0,21	0,34	0,54
3,41	2,05	1,52	0,90	2,11	2,44	0,31	0,19
2,61	1,58	2,07	1,45	4,38	3,42	0,33	0,35
1,91	1,14	2,04	1,32	3,29	3,02	2,56	0,23
2,34	1,39	1,47	3,01	2,98	1,99	2,59	0,43
1,52	2,23	1,02		2,76	2,75	1,07	4,00
1,47	2,50	0,95		1,64	2,95	1,87	1,71
1,45	2,36			2,71	0,51	3,40	2,17
				1,16			3,48
							1,65
							1,77
							1,81

Deskriptive Statistik TGF- β

Probenanzahl	8	8	7	5	9	8	8	12
Minimum	1,45	1,09	0,95	0,90	0,66	0,21	0,31	0,19
Maximum	3,94	2,50	2,07	3,01	4,38	3,42	3,40	4,00
Bereich	2,49	1,41	1,12	2,11	3,73	3,21	3,09	3,81
Mittelwert	2,33	1,79	1,54	1,69	2,41	2,16	1,56	1,53
Standardabweichung	0,94	0,56	0,44	0,80	1,15	1,19	1,22	1,26

Tabelle 31: Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 12 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 10

Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 12 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 10

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
A01	AKT1	0.87		0.147495
A02	ANG	1.34	B	0.508528
A03	ANGPT1	1.58		0.064964
A04	ANGPT2	0.75		0.207631
A05	ANGPTL4	1.36		0.349100
A06	ANPEP	1.52		0.008998
A07	BAI3	0.66	B	0.528582
A08	CDH5	0.93		0.819195
A09	COL18A1	0.97		0.959799
A10	COL4A3	1.12	C	0.167740
A11	CSF3	1.37	B	0.661284
A12	CTGF	0.84		0.541126
B01	EDN1	0.65		0.214408
B02	EDNRA	1.12		0.363167
B03	EFNA2	0.71		0.101349
B04	EFNB2	1.01		0.998694
B05	EGF	0.69	B	0.260349
B06	ENG	1.77		0.043630
B07	EPAS1	1.01		0.942249
B08	EPHB2	0.94		0.600149
B09	ERBB2	1.24		0.317680
B10	F2	1.06	B	0.158361
B11	F3	2.05		0.104520
B12	FGF1	0.78	B	0.392763
C01	FGF2	0.65		0.113946
C02	FGF6	1.04	B	0.815472
C03	FGFR3	0.71		0.004518
C04	FIGF	7.60		0.003505
C05	FLT1	1.38	B	0.140144

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 12 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 10**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
C06	FN1	0.87		0.259161
C07	HGF	0.44		0.090209
C08	HIF1A	0.74		0.018612
C09	HPSE	1.46	B	0.421610
C10	ID1	1.02		0.960053
C11	IFNA3	1.23		0.423565
C12	IFNB	1.10	B	0.699960
D01	IFNG	1.12	C	0.167740
D02	IGF1	1.24	B	0.567403
D03	IL1B	0.64	B	0.212936
D04	IL6	0.62	B	0.225345
D05	IL8L1	0.31	A	0.047605
D06	ITGAV	0.75		0.072195
D07	RP11- 290H9.2	0.53		0.061573
D08	JAG1	1.19		0.236575
D09	KDR	1.26		0.158724
D10	LECT1	1.22		0.322520
D11	LITAF	1.14	B	0.383655
D12	LOC422654	0.15		0.007995
E01	PGF	2.54	A	0.002634
E02	MAPK14	1.19		0.018371
E03	MDK	0.81		0.384754
E04	MMP14	1.11		0.682721
E05	MMP2	1.68		0.067877
E06	MMP9	0.51	B	0.249508
E07	NOS3	1.35		0.072145
E08	NOTCH1	1.08		0.535320
E09	NRP1	1.39		0.021035
E10	NRP2	1.17		0.051333
E11	PDGFA	0.82		0.199724
E12	PDGFB	1.40		0.034166
F01	PECAM1	1.77		0.023852
F02	PLAU	0.67	A	0.073484
F03	PLG	0.90	B	0.594261
F04	PROK2	0.66	B	0.060391
F05	PTGS1	2.07		0.005440
F06	PTK2	1.09		0.605039
F07	S1PR1	1.20		0.143785
F08	SERPINB5	0.55		0.144436
F09	SERPINE2	0.81		0.183182
F10	SERPINF1	0.87		0.471265

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 12 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 10**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
F11	SPHK1	1.01		0.957012
F12	TBX1	1.12		0.455719
G01	TEK	1.82		0.000619
G02	TGFA	0.60		0.185546
G03	TGFB2	0.76		0.069073
G04	TGFB3	0.97		0.784574
G05	TGFBR1	1.14		0.255648
G06	THBS1	0.36		0.058837
G07	THBS2	2.47		0.069638
G08	TIE1	1.57		0.011421
G09	TIMP2	0.70		0.064345
G10	TIMP3	0.82		0.403566
G11	VEGFA	0.84		0.455577
G12	VEGFC	1.89		0.013294
H01	ACTB	0.74		0.116361
H02	H6PD	0.99		0.938084
H03	HMBS	1.07		0.826467
H04	RPL4	1.01		0.917523
H05	UBC	1.09		0.555001

*Tabelle 32: Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den un-
behandelten Proben an EDD 10*

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 10**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
A01	AKT1	0.57		0.011034
A02	ANG	2.67	B	0.094483
A03	ANGPT1	0.91	A	0.417135
A04	ANGPT2	0.74		0.141380
A05	ANGPTL4	1.42		0.357419
A06	ANPEP	1.29		0.035476
A07	BAI3	0.33	B	0.124698
A08	CDH5	0.76		0.003677
A09	COL18A1	0.75		0.213850
A10	COL4A3	1.16	C	0.043627
A11	CSF3	2.12	B	0.282605
A12	CTGF	1.07		0.929483
B01	EDN1	0.70		0.329063

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 10**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
B02	EDNRA	0.68		0.173689
B03	EFNA2	0.42		0.028214
B04	EFNB2	0.66		0.101430
B05	EGF	1.07	B	0.758181
B06	ENG	1.48		0.058688
B07	EPAS1	0.66		0.195847
B08	EPHB2	0.64		0.020683
B09	ERBB2	1.10		0.662238
B10	F2	0.66		0.030007
B11	F3	2.34		0.050030
B12	FGF1	1.25	B	0.597267
C01	FGF2	0.57		0.089053
C02	FGF6	1.08	B	0.563722
C03	FGFR3	0.55		0.000745
C04	FIGF	11.84		0.033525
C05	FLT1	0.98	B	0.870707
C06	FN1	0.75		0.052767
C07	HGF	0.27	A	0.045290
C08	HIF1A	0.59		0.006461
C09	HPSE	1.98	A	0.117396
C10	ID1	0.81		0.369519
C11	IFNA3	1.94		0.204075
C12	IFNB	1.37	B	0.394167
D01	IFNG	1.16	C	0.043627
D02	IGF1	0.97	B	0.769008
D03	IL1B	1.11	B	0.623485
D04	IL6	0.59	B	0.199323
D05	IL8L1	0.28	A	0.492214
D06	ITGAV	0.52		0.011713
D07	RP11- 290H9.2	0.46		0.030501
D08	JAG1	1.01		0.966403
D09	KDR	0.88		0.369021
D10	LECT1	0.54	A	0.022069
D11	LITAF	0.84	B	0.346980
D12	LOC422654	0.54	B	0.477650
E01	PGF	2.00	A	0.045420
E02	MAPK14	1.08		0.145088
E03	MDK	5.74		0.374405
E04	MMP14	0.51		0.055144
E05	MMP2	0.97		0.853126
E06	MMP9	1.88	A	0.290454

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 10**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
E07	NOS3	1.26		0.201650
E08	NOTCH1	0.68		0.011959
E09	NRP1	1.11		0.112810
E10	NRP2	0.55		0.002846
E11	PDGFA	0.74		0.173476
E12	PDGFB	1.20		0.205203
F01	PECAM1	1.54		0.109646
F02	PLAU	0.58	A	0.013129
F03	PLG	1.90	B	0.148281
F04	PROK2	2.73	B	0.252213
F05	PTGS1	4.56		0.001769
F06	PTK2	0.82		0.164397
F07	S1PR1	1.04		0.764506
F08	SERPINB5	1.39		0.043126
F09	SERPINE2	0.70		0.222982
F10	SERPINF1	0.79		0.148034
F11	SPHK1	0.90		0.623472
F12	TBX1	0.75	A	0.167312
G01	TEK	1.39		0.010133
G02	TGFA	0.36	A	0.064429
G03	TGFB2	0.56		0.038002
G04	TGFB3	0.87		0.560014
G05	TGFBR1	0.96		0.530397
G06	THBS1	0.36		0.071472
G07	THBS2	2.70		0.006568
G08	TIE1	1.22		0.209299
G09	TIMP2	0.70		0.078359
G10	TIMP3	0.57		0.148202
G11	VEGFA	0.57		0.097839
G12	VEGFC	0.74		0.919749
H01	ACTB	0.46		0.022795
H02	H6PD	0.95		0.462954
H03	HMBS	1.72		0.196973
H04	RPL4	1.05		0.507529
H05	UBC	1.76		0.018039

Tabelle 33: Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 12

Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der unbehandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbehandelten Proben an EDD 12

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
A01	AKT1	0.66		0.020452
A02	ANG	1.99	B	0.183782
A03	ANGPT1	0.57	A	0.025745
A04	ANGPT2	0.99		0.908805
A05	ANGPTL4	1.05		0.777183
A06	ANPEP	0.85		0.171839
A07	BAI3	0.49	B	0.168949
A08	CDH5	0.82		0.292428
A09	COL18A1	0.77		0.277068
A10	COL4A3	1.04	C	0.603324
A11	CSF3	1.54	B	0.655297
A12	CTGF	1.27		0.396000
B01	EDN1	1.09		0.732254
B02	EDNRA	0.60		0.080225
B03	EFNA2	0.60		0.050624
B04	EFNB2	0.65		0.031353
B05	EGF	1.56	B	0.366928
B06	ENG	0.84		0.255234
B07	EPAS1	0.65		0.111852
B08	EPHB2	0.67		0.052237
B09	ERBB2	0.88		0.361690
B10	F2	0.62		0.016435
B11	F3	1.14		0.566106
B12	FGF1	1.60	B	0.346619
C01	FGF2	0.88		0.637842
C02	FGF6	1.04	C	0.603324
C03	FGFR3	0.76		0.032541
C04	FIGF	1.56		0.263738
C05	FLT1	0.71	B	0.088166
C06	FN1	0.86		0.273913
C07	HGF	0.62	A	0.081083
C08	HIF1A	0.79		0.107295
C09	HPSE	1.35	A	0.250017
C10	ID1	0.79		0.197542
C11	IFNA3	1.58		0.409736
C12	IFNB	1.24	B	0.812055
D01	IFNG	1.04	C	0.603324
D02	IGF1	0.78	B	0.463337
D03	IL1B	1.72	B	0.387860
D04	IL6	0.95	B	0.844579

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 12**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
D05	IL8L1	0.91	B	0.637475
D06	ITGAV	0.69		0.016795
D07	RP11- 290H9.2	0.86		0.348924
D08	JAG1	0.85		0.240118
D09	KDR	0.70		0.020143
D10	LECT1	0.44	A	0.027881
D11	LITAF	0.74	B	0.112852
D12	LOC422654	3.61	B	0.219403
E01	PGF	0.79		0.192880
E02	MAPK14	0.90		0.042358
E03	MDK	7.07		0.374271
E04	MMP14	0.46		0.017058
E05	MMP2	0.58		0.059032
E06	MMP9	3.66	A	0.039980
E07	NOS3	0.94		0.766920
E08	NOTCH1	0.63		0.015324
E09	NRP1	0.80		0.064363
E10	NRP2	0.47		0.001051
E11	PDGFA	0.91		0.578779
E12	PDGFB	0.86		0.130853
F01	PECAM1	0.87		0.452652
F02	PLAU	0.87	B	0.481732
F03	PLG	2.12	B	0.067110
F04	PROK2	4.11	B	0.206223
F05	PTGS1	2.20		0.008125
F06	PTK2	0.75		0.120425
F07	S1PR1	0.87		0.069861
F08	SERPINB5	2.51		0.031176
F09	SERPINE2	0.86		0.645497
F10	SERPINF1	0.91		0.618287
F11	SPHK1	0.89		0.579915
F12	TBX1	0.67	A	0.050925
G01	TEK	0.76		0.018567
G02	TGFA	0.60	A	0.122891
G03	TGFB2	0.73		0.244819
G04	TGFB3	0.90		0.651491
G05	TGFBR1	0.84		0.170762
G06	THBS1	1.02		0.848046
G07	THBS2	1.09		0.907042
G08	TIE1	0.78		0.025877
G09	TIMP2	1.00		0.971246

**Rohdaten des RT² Profiler qPCR Arrays, Gruppe der un-
behandelten Proben an EDD 14 im Vergleich zu den unbe-
handelten Proben an EDD 12**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
G10	TIMP3	0.70		0.012899
G11	VEGFA	0.67		0.080463
G12	VEGFC	0.39		0.168540
H01	ACTB	0.62		0.026564
H02	H6PD	0.95		0.558591
H03	HMBS	1.60		0.211737
H04	RPL4	1.04		0.581801
H05	UBC	1.61		0.098275

*Tabelle 34: Rohdaten des an EDD 10 durchgeführten RT² Profiler qPCR Arrays mit den be-
handelten Proben, entnommen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der
unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe*

**Rohdaten des an EDD 10 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnom-
men 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Posi- tion	Genbezeich- nung	<i>Fold Change</i>	Kommen- tar	p-Wert
A01	AKT1	0.92		0.373585
A02	ANG	0.77	B	0.363994
A03	ANGPT1	1.06	A	0.752299
A04	ANGPT2	1.27		0.503382
A05	ANGPTL4	1.90		0.117223
A06	ANPEP	0.88		0.232254
A07	BAI3	0.91	B	0.698500
A08	CDH5	0.55		0.004547
A09	COL18A1	1.22		0.309379
A10	COL4A3	1.24	C	0.021574
A11	CSF3	3.48	B	0.213779
A12	CTGF	1.06		0.991392
B01	EDN1	1.02		0.941384
B02	EDNRA	0.90		0.410271
B03	EFNA2	1.07		0.753602
B04	EFNB2	0.51		0.033991
B05	EGF	0.76	B	0.347541
B06	ENG	0.93		0.571495
B07	EPAS1	0.60		0.145759
B08	EPHB2	1.08		0.530565
B09	ERBB2	1.01		0.932174
B10	F2	0.65		0.021504

**Rohdaten des an EDD 10 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Position	Genbezeichnung	Fold Change	Kommentar	p-Wert
B11	F3	0.82		0.498931
B12	FGF1	1.16	B	0.782992
C01	FGF2	1.92		0.029663
C02	FGF6	1.15	B	0.295225
C03	FGFR3	1.05		0.661364
C04	FIGF	0.48	A	0.072361
C05	FLT1	0.75	B	0.147275
C06	FN1	1.18		0.162514
C07	HGF	1.19		0.659501
C08	HIF1A	1.18		0.315525
C09	HPSE	0.99	B	0.763071
C10	ID1	0.58		0.219314
C11	IFNA3	0.78		0.606997
C12	IFNB	1.21	B	0.566002
D01	IFNG	1.24	C	0.021574
D02	IGF1	0.45	B	0.087867
D03	IL1B	1.87	B	0.345098
D04	IL6	1.63	A	0.377945
D05	IL8L1	1.48		0.322912
D06	ITGAV	1.35		0.074135
D07	RP11-290H9.2	1.47		0.203186
D08	JAG1	0.80		0.238554
D09	KDR	0.46		0.015243
D10	LECT1	1.09		0.494118
D11	LITAF	0.85	B	0.386687
D12	LOC422654	4.31	A	0.175285
E01	PGF	1.13	B	0.679548
E02	MAPK14	0.97		0.531550
E03	MDK	0.80		0.515880
E04	MMP14	1.03		0.988488
E05	MMP2	1.38		0.191464
E06	MMP9	2.37	A	0.205995
E07	NOS3	0.69		0.095834
E08	NOTCH1	0.80		0.160486
E09	NRP1	0.93		0.129121
E10	NRP2	0.98		0.635255
E11	PDGFA	1.13		0.460395
E12	PDGFB	0.85		0.721769
F01	PECAM1	0.52		0.057051
F02	PLAU	1.08		0.577864
F03	PLG	0.99	B	0.821892

**Rohdaten des an EDD 10 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Position	Genbezeichnung	Fold Change	Kommentar	p-Wert
F04	PROK2	1.18	B	0.556965
F05	PTGS1	1.05		0.561507
F06	PTK2	0.83		0.173929
F07	S1PR1	0.81		0.506294
F08	SERPINB5	1.34		0.202173
F09	SERPINE2	1.22		0.210287
F10	SERPINF1	0.91		0.841428
F11	SPHK1	1.38		0.176107
F12	TBX1	0.52	A	0.013225
G01	TEK	0.47		0.000349
G02	TGFA	1.31		0.546966
G03	TGFB2	1.09		0.578948
G04	TGFB3	1.06		0.716141
G05	TGFBR1	1.11		0.243829
G06	THBS1	1.24		0.515874
G07	THBS2	1.00		0.851079
G08	TIE1	0.52		0.014355
G09	TIMP2	1.72		0.098396
G10	TIMP3	0.75		0.412986
G11	VEGFA	0.56		0.101192
G12	VEGFC	0.79		0.442728
H01	ACTB	1.37		0.193606
H02	H6PD	0.98		0.783235
H03	HMBS	0.94		0.686632
H04	RPL4	1.02		0.800128
H05	UBC	0.80		0.778146

Tabelle 35: Rohdaten des an EDD 12 durchgeführten RT² Profiler qPCR Arrays mit den behandelten Proben, entnommen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe

**Rohdaten des an EDD 12 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
A01	AKT1	0.92		0.377251
A02	ANG	1.01	B	0.819483
A03	ANGPT1	0.63	A	0.041389

**Rohdaten des an EDD 12 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
A04	ANGPT2	1.53		0.069076
A05	ANGPTL4	2.10		0.041984
A06	ANPEP	0.58		0.005025
A07	BAI3	0.54	B	0.191547
A08	CDH5	0.52		0.041537
A09	COL18A1	0.10		0.797357
A10	COL4A3	1.08	C	0.518155
A11	CSF3	3.04	B	0.190334
A12	CTGF	1.65		0.048273
B01	EDN1	1.34		0.336493
B02	EDNRA	0.80		0.291442
B03	EFNA2	1.01		0.856506
B04	EFNB2	0.48		0.000157
B05	EGF	1.49	B	0.176415
B06	ENG	0.51		0.015317
B07	EPAS1	0.59		0.021731
B08	EPHB2	1.01		0.951539
B09	ERBB2	1.17		0.303034
B10	F2	0.55		0.000115
B11	F3	1.62		0.023130
B12	FGF1	1.64		0.002642
C01	FGF2	3.18		0.012968
C02	FGF6	1.08	C	0.518155
C03	FGFR3	0.93		0.824268
C04	FIGF	0.21		0.005754
C05	FLT1	0.56		0.023091
C06	FN1	3.90		0.355756
C07	HGF	2.15		0.032069
C08	HIF1A	1.54		0.049229
C09	HPSE	1.01	B	0.985467
C10	ID1	0.57		0.040955
C11	IFNA3	1.01		0.883783
C12	IFNB	1.24	B	0.922760
D01	IFNG	1.08	C	0.518155
D02	IGF1	0.38	B	0.159758
D03	IL1B	3.35	B	0.090606
D04	IL6	3.33	A	0.000586
D05	IL8L1	7.66	A	0.085797
D06	ITGAV	1.55		0.028840
D07	RP11-290H9.2	2.42		0.002980

**Rohdaten des an EDD 12 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
D08	JAG1	0.75		0.052235
D09	KDR	0.37		0.000881
D10	LECT1	0.67		0.090649
D11	LITAF	0.81	B	0.093259
D12	LOC422654	14.87		0.006147
E01	PGF	0.55	A	0.006406
E02	MAPK14	0.82		0.021071
E03	MDK	0.79		0.219032
E04	MMP14	0.90		0.513739
E05	MMP2	0.82		0.286975
E06	MMP9	4.35	A	0.012674
E07	NOS3	0.51		0.010491
E08	NOTCH1	0.73		0.083698
E09	NRP1	0.66		0.017504
E10	NRP2	0.88		0.423725
E11	PDGFA	1.65		0.012463
E12	PDGFB	0.62		0.023901
F01	PECAM1	0.33		0.001658
F02	PLAU	1.74	A	0.029059
F03	PLG	1.08	C	0.518155
F04	PROK2	3.57		0.003673
F05	PTGS1	0.56		0.010254
F06	PTK2	0.66		0.053472
F07	S1PR1	0.61		0.000387
F08	SERPINB5	2.77		0.025025
F09	SERPINE2	1.72		0.022135
F10	SERPINF1	1.33		0.239632
F11	SPHK1	1.42		0.069051
F12	TBX1	0.63	A	0.011718
G01	TEK	0.26		0.000145
G02	TGFA	2.70		0.009718
G03	TGFB2	1.27		0.183076
G04	TGFB3	1.33		0.090372
G05	TGFBR1	0.93		0.471677
G06	THBS1	4.48		0.011302
G07	THBS2	0.73		0.419368
G08	TIE1	0.33		0.000057
G09	TIMP2	2.41		0.013291
G10	TIMP3	1.77		0.145949
G11	VEGFA	0.60		0.056724
G12	VEGFC	0.42		0.007280

**Rohdaten des an EDD 12 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der
Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als
Kontrollgruppe**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
H01	ACTB	1.63		0.056188
H02	H6PD	0.90		0.321697
H03	HMBS	0.89		0.445142
H04	RPL4	1.09		0.299944
H05	UBC	1.23		0.475340

Tabelle 36: Rohdaten des an EDD 14 durchgeführten RT² Profiler qPCR Arrays mit den behandelten Proben, entnommen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe

**Rohdaten des an EDD 14 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der
unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe**

Position	Symbol	Fold Change	Kommentar	p-Wert
A01	AKT1	1.10		0.577245
A02	ANG	1.25	B	0.603773
A03	ANGPT1	0.79	B	0.107988
A04	ANGPT2	1.21		0.173357
A05	ANGPTL4	1.85		0.037492
A06	ANPEP	0.53		0.019201
A07	BAI3	0.88	B	0.418741
A08	CDH5	0.62		0.003997
A09	COL18A1	1.10		0.623643
A10	COL4A3	0.97	C	0.883329
A11	CSF3	1.06	B	0.751424
A12	CTGF	1.21		0.566226
B01	EDN1	0.80		0.377442
B02	EDNRA	1.20		0.583582
B03	EFNA2	1.21		0.540434
B04	EFNB2	0.69		0.113987
B05	EGF	2.63	B	0.284164
B06	ENG	0.76		0.213383
B07	EPAS1	0.83		0.358292
B08	EPHB2	1.35		0.186871
B09	ERBB2	1.34		0.009093
B10	F2	0.93	B	0.681093
B11	F3	1.30		0.188772
B12	FGF1	1.05	B	0.846548

**Rohdaten des an EDD 14 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der
unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
C01	FGF2	0.40	A	0.747860
C02	FGF6	1.02	B	0.811580
C03	FGFR3	0.97		0.938814
C04	FIGF	0.98		0.896449
C05	FLT1	0.85	B	0.272018
C06	FN1	1.31		0.041806
C07	HGF	1.60	A	0.220069
C08	HIF1A	1.18		0.300001
C09	HPSE	0.83		0.368593
C10	ID1	0.70		0.091753
C11	IFNA3	1.08		0.926165
C12	IFNB	1.42	B	0.365490
D01	IFNG	0.97	C	0.883329
D02	IGF1	0.28		0.002013
D03	IL1B	1.36	B	0.903277
D04	IL6	1.30	B	0.232861
D05	IL8L1	2.25	B	0.894038
D06	ITGAV	1.33		0.054880
D07	RP11- 290H9.2	1.46		0.012310
D08	JAG1	1.02		0.909563
D09	KDR	0.49		0.002301
D10	LECT1	1.03	B	0.904319
D11	LITAF	1.31	B	0.387595
D12	LOC422654	2.71	B	0.209385
E01	PGF	0.60	A	0.063760
E02	MAPK14	0.90		0.132994
E03	MDK	0.13		0.374216
E04	MMP14	0.96		0.809118
E05	MMP2	0.98		0.951243
E06	MMP9	1.43		0.358569
E07	NOS3	0.78		0.409613
E08	NOTCH1	1.36		0.006207
E09	NRP1	0.79		0.035018
E10	NRP2	1.54		0.032298
E11	PDGFA	1.52		0.044319
E12	PDGFB	0.83		0.141216
F01	PECAM1	0.50		0.022762
F02	PLAU	1.36	B	0.111953
F03	PLG	1.43	B	0.241027
F04	PROK2	2.31	B	0.262930

**Rohdaten des an EDD 14 durchgeführten RT² Profiler
qPCR Arrays mit den behandelten Proben an, entnommen
6 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy, und der Gruppe der
unbehandelten Proben desselben EDD als Kontrollgruppe**

Position	Symbol	<i>Fold Change</i>	Kommentar	p-Wert
F05	PTGS1	0.75		0.158850
F06	PTK2	0.96		0.588626
F07	S1PR1	0.86		0.075424
F08	SERPINB5	2.02		0.041265
F09	SERPINE2	1.56		0.096217
F10	SERPINF1	1.43		0.094013
F11	SPHK1	1.09		0.683844
F12	TBX1	0.57		0.043376
G01	TEK	0.42		0.001156
G02	TGFA	1.49	A	0.183741
G03	TGFB2	1.20		0.542442
G04	TGFB3	1.02		0.983323
G05	TGFBR1	1.21		0.175956
G06	THBS1	2.25		0.071316
G07	THBS2	0.82		0.293615
G08	TIE1	0.44		0.002077
G09	TIMP2	1.33		0.172589
G10	TIMP3	1.35		0.168856
G11	VEGFA	0.69		0.142659
G12	VEGFC	1.29		0.844797
H01	ACTB	1.66		0.072412
H02	H6PD	0.91		0.036322
H03	HMBS	0.97		0.819273
H04	RPL4	1.07		0.045265
H05	UBC	0.70		0.334447

8 Literaturverzeichnis

1. Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP, et al. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. *J Vis Exp*. 2009(33).
2. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*. 2016;141:70-7.
3. Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol*. 1974;41(2):391-4.
4. Murphy JB, Rous P. The Behavior of Chicken Sarcoma Implanted in the Developing Embryo. *J Exp Med*. 1912;15(2):119-32.
5. Moore M. The Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos and Its Response to Inoculation with Some Mycobacteria. *Am J Pathol*. 1942;18(5):827-47.
6. Luepke NP, Kemper FH. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*. 1986;24(6):495-6.
7. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*. 2014;17(4):779-804.
8. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique: Methuen; 1959.
9. Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V. Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152821.
10. Müller WA, Hassel M. *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen*. 6th ed. 2018 ed. Berlin, Heidelberg 2018.
11. *Embryologie der Haustiere*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2011. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-46958>.
12. Drews U. *Taschenatlas der Embryologie*. Stuttgart u.a. 1993.
13. Patten BM. *Early embryology of the chick*: Wildside Press LLC; 2008.
14. Romanoff AL. *The avian embryo. Structural and functional development*. The avian embryo Structural and functional development. 1960.
15. Wong EA, Uni Z. Centennial Review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poultry Science*. 2021;100(3):100821.
16. Bauer R, Plietschnig JA, Finkes T, Riegler B, Hermann M, Schneider WJ. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2013;288(2):1088-98.
17. Yadgary L, Kedar O, Adepeju O, Uni Z. Changes in yolk sac membrane absorptive area and fat digestion during chick embryonic development. *Poultry Science*. 2013;92(6):1634-40.
18. Overton J. Fusion of epithelial sheets as seen in formation of the chick amnion. *Cell Tissue Res*. 1989;257(1):141-7.
19. Freeman BM, Vince MA. *Development of the avian embryo: a behavioural and physiological study*: Springer; 1974.
20. Givisiez PEN, Moreira Filho ALB, Santos MRB, Oliveira HB, Ferket PR, Oliveira CJB, et al. Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult Sci*. 2020;99(12):6774-82.
21. De Oliveira JE. *Effects of In ovo Feeding on Turkey Embryos Development, Energy Status, Intestinal Maturation, Gene Expression and Post-hatch Development*. 2008.
22. Evans HE. *Avian Diseases*. 1960;4(4):541-2.
23. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Chorioallantoic membrane vascularization. A meta-analysis. *Exp Cell Res*. 2021;405(2):112716.
24. FánCSI T, Fehér G. Ultrastructural Studies of Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane during Incubation. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 1979;8(2):151-9.
25. DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, Feinberg RN. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvascular Research*. 1989;38(2):136-47.

26. Schlatter P, König MF, Karlsson LM, Burri PH. Quantitative Study of Intussusceptive Capillary Growth in the Chorioallantoic Membrane (CAM) of the Chicken Embryo. *Microvascular Research*. 1997;54(1):65-73.
27. Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *Journal of Experimental Zoology*. 2002;292(3):241-54.
28. Gabrielli MG, Accili D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010.
29. Hincke MT, Da Silva M, Guyot N, Gautron J, McKee MD, Guabiraba-Brito R, et al. Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components during Incubation of the Avian Egg: Critical Interplay between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation. *J Innate Immun*. 2019;11(2):111-24.
30. Garcia P, Wang Y, Viallet J, Macek Jilkova Z. The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. *Front Immunol*. 2021;12:791081.
31. Khatri M, Sharma JM. Response of embryonic chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2009;127(3-4):316-24.
32. Guyot N, Réhault-Godbert S, Slugocki C, Harichaux G, Labas V, Helloin E, et al. Characterization of egg white antibacterial properties during the first half of incubation: A comparative study between embryonated and unfertilized eggs. *Poultry Science*. 2016;95(12):2956-70.
33. Alabdeh M, Lechevalier V, Nau F, Gautier M, Cochet M-F, Gonnet F, et al. Role of incubation conditions and protein fraction on the antimicrobial activity of egg white against *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*. *Journal of food protection*. 2011;74(1):24-31.
34. Schneider WR, Doetsch R. Effect of viscosity on bacterial motility. *Journal of bacteriology*. 1974;117(2):696-701.
35. Mann K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics*. 2008;8(11):2322-32.
36. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, Roth TF. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*. 1985;54(4):755-62.
37. Balic A, Garcia-Morales C, Vervelde L, Gilhooley H, Sherman A, Garceau V, et al. Visualisation of chicken macrophages using transgenic reporter genes: insights into the development of the avian macrophage lineage. *Development*. 2014;141(16):3255-65.
38. Valdes T, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2002;62(2):273-82.
39. Zijlstra A, Aimes RT, Zhu D, Regazzoni K, Kupriyanova T, Seandel M, et al. Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). *J Biol Chem*. 2004;279(26):27633-45.
40. Qureshi MA, Heggen CL, Hussain I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Developmental & Comparative Immunology*. 2000;24(2-3):103-19.
41. Kaspers B, Schat KA, Göbel T, Vervelde L. *Avian immunology*: Academic Press; 2021.
42. Tay H, Du Cheyne C, Demeyere K, De Craene J, De Bels L, Meyer E, et al. Depletion of Embryonic Macrophages Leads to a Reduction in Angiogenesis in the Ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane Assay. *Cells*. 2020;10(1).
43. Dóra D, Fejszák N, Goldstein AM, Minkó K, Nagy N. Ontogeny of ramified CD45 cells in chicken embryo and their contribution to bursal secretory dendritic cells. *Cell and Tissue Research*. 2017;368:353-70.
44. Nagy N, Bódi I, Oláh I. Avian dendritic cells: phenotype and ontogeny in lymphoid organs. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016;58:47-59.
45. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a011247.

46. Kannaki T, Reddy M, Verma P, Shanmugam M. Differential Toll-like receptor (TLR) mRNA expression patterns during chicken embryological development. *Animal biotechnology*. 2015;26(2):130-5.
47. Schilling MA, Katani R, Memari S, Cavanaugh M, Buza J, Radzio-Basu J, et al. Transcriptional innate immune response of the developing chicken embryo to Newcastle disease virus infection. *Frontiers in genetics*. 2018;9:61.
48. Davison T. The immunologists' debt to the chicken. *British poultry science*. 2003;44(1):6-21.
49. Viallard C, Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409-26.
50. Kretschmer M, Rudiger D, Zahler S. Mechanical Aspects of Angiogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19).
51. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res*. 2010;31(1):158-75.
52. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-64.
53. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
54. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular Diversity*. 2006;10(4):515-27.
55. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):154-65.
56. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):549-60.
57. Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *J Biochem*. 2014;156(1):1-10.
58. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a006569.
59. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *The FASEB Journal*. 2000;14(13):2087-96.
60. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163-77.
61. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):203-12.
62. Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*. 2009;16(2):222-31.
63. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-69.
64. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:176-82.
65. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.
66. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-32.
67. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22642-7.
68. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5.
69. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10430-5.

70. Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(13):5680-4.
71. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1469-80.
72. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1: interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(12):9519-25.
73. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer research*. 1999;59(16):3915-8.
74. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor. *Cancer research*. 2003;63(5):1138-43.
75. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5' enhancer. *Circulation research*. 1995;77(3):638-43.
76. Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(9):4604-13.
77. Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, Lahat N. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2005;289(5):C1321-C31.
78. Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol*. 2018;81:241-330.
79. Dufour A, Overall CM. Subtracting matrix out of the equation: new key roles of matrix metalloproteinases in innate immunity and disease. *Matrix Metalloproteinase Biology*. 2015:131-52.
80. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003;92(8):827-39.
81. Eklund L, Saharinen P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental cell research*. 2013;319(9):1271-80.
82. Thurston G, Daly C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(9):a006550.
83. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(3):165-77.
84. Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells*. 2019;8(5).
85. Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T. Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;195(1):301-9.
86. Partanen J, Armstrong E, Mäkelä T, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(4):1698-707.
87. Woo KV, Baldwin HS. Role of Tie1 in shear stress and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2011;21(4):118-23.
88. Puri MC, Bernstein A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(22):12753-8.
89. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.
90. Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol*. 2009;29(8):2011-22.
91. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(17):11205-10.

92. Peng D, Fu M, Wang M, Wei Y, Wei X. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022;21(1):104.
93. Larson C, Oronsky B, Carter CA, Oronsky A, Knox SJ, Sher D, et al. TGF-beta: a master immune regulator. *Expert Opin Ther Targets*. 2020;24(5):427-38.
94. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(5).
95. Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res*. 2018;6:2.
96. van Meeteren LA, Goumans MJ, ten Dijke P. TGF- β receptor signaling pathways in angiogenesis; emerging targets for anti-angiogenesis therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(12):2108-20.
97. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *The EMBO journal*. 2002;21(7):1743-53.
98. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, et al. Activin receptor-like kinase (ALK) 1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Molecular cell*. 2003;12(4):817-28.
99. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).
100. Papaioannou VE. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development*. 2014;141(20):3819-33.
101. Baldini A, Fulcoli FG, Illingworth E. Tbx1: Transcriptional and Developmental Functions. *Curr Top Dev Biol*. 2017;122:223-43.
102. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*. 2001;104(4):619-29.
103. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001;410(6824):97-101.
104. Vitelli F, Taddei I, Morishima M, Meyers EN, Lindsay EA, Baldini A. A genetic link between Tbx1 and fibroblast growth factor signaling. 2002.
105. Chen L, Mupo A, Huynh T, Cioffi S, Woods M, Jin C, et al. Tbx1 regulates Vegfr3 and is required for lymphatic vessel development. *Journal of Cell Biology*. 2010;189(3):417-24.
106. Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A, et al. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(20):7729-34.
107. Cioffi S, Martucciello S, Fulcoli FG, Bilio M, Ferrentino R, Nusco E, et al. Tbx1 regulates brain vascularization. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(1):78-89.
108. Marinaccio C, Nico B, Ribatti D. Differential expression of angiogenic and anti-angiogenic molecules in the chick embryo chorioallantoic membrane and selected organs during embryonic development. *Int J Dev Biol*. 2013;57(11-12):907-16.
109. Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Tsunematsu T, Kondo T, Subarnbhesaj A, et al. Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) Directly and Indirectly Promotes Tumor Angiogenesis *. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(46):38716-28.
110. Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol*. 1990;111(2):731-41.
111. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
112. Parmar D, Apte M. Angiotensin inhibitors: A review on targeting tumor angiogenesis. *Eur J Pharmacol*. 2021;899:174021.
113. Dunleavey JM, Dudley AC. Vascular Mimicry: Concepts and Implications for Anti-Angiogenic Therapy. *Curr Angiogenes*. 2012;1(2):133-8.

114. Delgado-Bellido D, Oliver FJ, Vargas Padilla MV, Lobo-Selma L, Chacón-Barrado A, Díaz-Martin J, et al. VE-Cadherin in Cancer-Associated Angiogenesis: A Deceptive Strategy of Blood Vessel Formation. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11).
115. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:4-10.
116. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-5.
117. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993;362(6423):841-4.
118. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-42.
119. Choi H-J, Armaiz Pena GN, Pradeep S, Cho MS, Coleman RL, Sood AK. Anti-vascular therapies in ovarian cancer: moving beyond anti-VEGF approaches. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2015;34(1):19-40.
120. Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Development of Third-Generation Anti-Angiogenic Drug Candidates. *Genes & Cancer.* 2010;1(1):12-25.
121. Li S, Pritchard DM, Yu LG. Regulation and Function of Matrix Metalloproteinase-13 in Cancer Progression and Metastasis. *Cancers (Basel).* 2022;14(13).
122. Roberts AB, Thompson NL, Heine U, Flanders C, Sporn MB. Transforming growth factor-beta: possible roles in carcinogenesis. *Br J Cancer.* 1988;57(6):594-600.
123. Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W, et al. Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2002;97(2):142-8.
124. Sun H, Miao C, Liu W, Qiao X, Yang W, Li L, et al. TGF- β 1/T β RII/Smad3 signaling pathway promotes VEGF expression in oral squamous cell carcinoma tumor-associated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;497(2):583-90.
125. Miyazono K, Ehata S, Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups J Med Sci.* 2012;117(2):143-52.
126. Liu D, Li L, Zhang XX, Wan DY, Xi BX, Hu Z, et al. SIX1 promotes tumor lymphangiogenesis by coordinating TGF β signals that increase expression of VEGF-C. *Cancer Res.* 2014;74(19):5597-607.
127. Ramjiawan RR, Griffioen AW, Duda DG. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis.* 2017;20(2):185-204.
128. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):393-410.
129. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell.* 2003;3(4):347-61.
130. Chang Q, Jurisica I, Do T, Hedley DW. Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer. *Cancer research.* 2011;71(8):3110-20.
131. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and-independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Molecular and cellular biology.* 2004;24(7):2875-89.
132. Farhood B, khodamoradi E, Hoseini-Ghahfarokhi M, Motevaseli E, Mirtavoos-Mahyari H, Eleojo Musa A, et al. TGF- β in radiotherapy: Mechanisms of tumor resistance and normal tissues injury. *Pharmacological Research.* 2020;155:104745.
133. Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1).

134. Gil Marques F, Poli E, Malaquias J, Carvalho T, Portêlo A, Ramires A, et al. Low doses of ionizing radiation activate endothelial cells and induce angiogenesis in peritumoral tissues. *Radiotherapy and Oncology*. 2020;151:322-7.
135. Marques FG, Carvalho L, Sousa JS, Rino J, Diegues I, Poli E, et al. Low doses of ionizing radiation enhance angiogenesis and consequently accelerate post-embryonic development but not regeneration in zebrafish. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3137.
136. Lee WH, Cho HJ, Sonntag WE, Lee YW. Radiation attenuates physiological angiogenesis by differential expression of VEGF, Ang-1, tie-2 and Ang-2 in rat brain. *Radiat Res*. 2011;176(6):753-60.
137. Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *Journal of cell science*. 1997;110(5):583-8.
138. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
139. Kabacik S, Raj K. Ionising radiation increases permeability of endothelium through ADAM10-mediated cleavage of VE-cadherin. *Oncotarget*. 2017;8(47):82049-63.
140. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circulation research*. 2008;102(10):1192-201.
141. Kouam PN, Rezniczek GA, Adamietz IA, Bühler H. Ionizing radiation increases the endothelial permeability and the transendothelial migration of tumor cells through ADAM10-activation and subsequent degradation of VE-cadherin. *BMC Cancer*. 2019;19(1):958.
142. Rani V, Prabhu A. Combining Angiogenesis Inhibitors with Radiation: Advances and Challenges in Cancer Treatment. *Curr Pharm Des*. 2021;27(7):919-31.
143. Ribatti D, Annese T, Tamma R. The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials. *Microvasc Res*. 2020;131:104026.
144. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo j*. 2002;21(7):1743-53.
145. Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinnars BL. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2000;19:167-72.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meiner Betreuerin für die enorme Unterstützung sowohl bei den praktischen Laborarbeiten als auch bei der Anfertigung des Dissertationsschreibens.

Gleichermaßen möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater für die Überlassung des Promotionsthemas und das Bereitstellen aller Mittel, die für meine Forschungen nötig waren, bedanken.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universitätsmedizin Mainz, die mich bei der praktischen Umsetzung meiner Arbeit tagtäglich unterstützt haben.

Zu guter Letzt möchte ich alldenjenigen Personen, die mir nahestehen, für ihre unerbittlichen Ermutigungen und Zusprüche während der Zeit, in der ich diese Dissertation angefertigt habe, danken.

10 Tabellarischer Lebenslauf