

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Albumin aus Rinderserum	BSA Fraction V	PAA, Linz, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	>99,5 % (GC)	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Dithiotreitol	Ultra Pure	GibcoBRL, Karlsruhe
dNTP	Mix	Invitrogen, Karlsruhe
EGF	Unterkieferdrüsenextrakt Maus	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Ethanol	absolut	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Ethidiumbromid	>95 % (HPLC)	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
5-Fluorouracil	>99,5 % (TLC)	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Glukose	D (+) – Glukose Monohydrat	Merck Eurolab, Darmstadt
Hanks' balancierte Salzlösung (HBSS)	ohne Phenolrot, mit 0,35 g / l NaHCO ₃	Biochrom, Berlin
IGF-1	rekombinant human, Long TM R ³	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Kohlendioxid	2.7	AGA Gas, Hamburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)		GibcoBRL, Karlsruhe
Methionin	L – Methionin	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
MMLV-Reverse Transferase		GibcoBRL, Karlsruhe
PCR-Puffer	10-fach	GibcoBRL, Karlsruhe
Penicillin G	Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Random Hexamer Oligonucleotide	10-fach	Boehringer, Ingelheim
Retinsäure (<i>all-trans</i> -)	>98%	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
RNasin [®]	Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
RT-Puffer	5-fach	GibcoBRL, Karlsruhe
Sauerstoff	Medizinischer	AGA Gas, Hamburg
Stickstoff	Plus 5.0	AGA Gas, Hamburg
Taq DNA Polymerase		GibcoBRL, Karlsruhe
TRIZOL Reagent		GibcoBRL, Karlsruhe
VEGF	rekombinant human	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Valproinsäure	Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen

4.1.2 Sterilität

4.1.2.1 Instrumente und Materialien

Alle Instrumente und Materialien wurden sterilisiert eingesetzt. Unsterile Materialien bzw. wieder zu verwendende Instrumente wurden für 30 min bei 135 °C und 100 kPa autoklaviert (Standautoklav, Tuttnauer 3870 ELV PV, Systec, Wetztenberg).

4.1.2.2 Flüssigkeiten und Gase

Seren, Puffer, Lösungen sowie die Gasgemische wurden sterilfiltriert. Für die Flüssigkeiten wurden gebrauchsfertige Filtereinheiten für Seren mit einer Porengröße von 0,2 µm (Celtron 30 / 0,2 CA – GF 92 – S, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Die Gasgemische für die Begasung der Kulturflaschen wurden durch gebrauchsfertige Filtereinheiten für Gase mit einer Porengröße von 0,2 µm (FP 30 / 0,2 CA–S, Schleicher & Schuell, Dassel) geleitet.

4.1.3 Labormaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aderlasskanüle	Ø 2,0 x 100 mm	Martin, Tuttlingen
Aluminiumkappen	20 mm für Standflaschen, 50 ml	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Biopsie – Kanüle	Menghini, Ø 2,0 x 168 mm	Martin, Tuttlingen
Einmalspritze	Luer - Lok, 20 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einmalspritze	Discardit II, 10 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einmalspritze	1 ml	Terumo Europe, Leuven
Filtereinheiten	Celtron 30 / 0,2 µm für Serum	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtereinheiten	FP 30 / 0,2 µm für Gase	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtersystem	Stericup, Porengröße 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Filtersystem	Stericup, Porengröße 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Glasrührstab	20 cm	Merck Eurolab, Darmstadt
Gummistopfen	20 mm für Standflaschen, 50 ml	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Homogenisationskegel	Pistill	Eppendorf, Hamburg
Laborflaschen	mit Gewinde, 100 ml	Schott, Mainz
Magnetrührstab	zylindrisch, 2 / 3 / 5 cm	Merck Eurolab, Darmstadt
Operationsmaske	Tie On	3M, Borken
Pasteurpipetten	15 cm, Glas	Brand, Wertheim
Petrischalen (bakteriologisch)	Ø 10 cm	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Pinzette	feines Modell	Martin, Tuttlingen
Pinzette	nach Dumont, gebogen	Martin, Tuttlingen
Pinzette	nach Dumont, gerade	Martin, Tuttlingen
Pinzette	chirurgische, 1 : 2 Zähne	Martin, Tuttlingen
Pipettenspitzen	Plastikbrand, 200/1000 µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Standartips, 20 µl	Eppendorf, Hamburg
Proteinbestimmungskit	DC – Protein Assay	Biorad, München
Reaktionsgefäße	Safe Lock, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	MicroAmp TM , 0,2 ml	Perkin Elmer, Shelton
Schere, chirurgische	13 cm, Standard	Martin, Tuttlingen
Schere, chirurgische	11 cm, Standard	Marin, Tuttlingen
Standflaschen	Enghals, 50 ml	Merck Eurolab, Darmstadt
Standflaschen	Enghals, 50 ml	Merck Eurolab, Darmstadt
Wägebapier	MN 226	Macherey-Nagel, Düren
Zentrifugengläser	80 ml Duran ®	Schott, Mainz

4.2 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Auswertungsprogramm	Microplate Manager 4.0	Biorad, Hercules, USA
Autoklav	Tuttnauer 3870 ELV PV	Systec, Wetztenberg
Dekapitator	Mod. 130	Harvard Apparatus, March
Digitalkamera	E995	Nikon, Düsseldorf
Elektrophorese PowerSupply	ST 606 T	Gibco BRL, Karlsruhe
Gasmischer	KM 60 – 3 SE SO	Witt-Gastechnik, Witten
Geldokumentationssystem	Diana III	Raytest, Straubenhardt
Grafikprogramm	Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
Grafikanalyse Software	AIDA	Raystest, Straubenhardt
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kaltlichtquelle	KL 1500	Schott Glaswerke, Wiesbaden
Kreisschüttler	IKA KS 125 basic	Janke & Kunkel, Staufen
Küvettenphotometer	UV-VIS 1202	Shimadzu, Duisburg
Laborrührwerk	IKA – RW 15	Junke & Kunkel, Staufen
Laborthermometer	0,1 °C skaliert	Brand, Wertheim
Mehrkanalpipette	Octapette	Costar, New York, USA
PCR-Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten	Reference, variabel	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Easypet®	Eppendorf, Hamburg
Plattenphotometer	Microplate Reader 3550	Biorad, München
Plattenphotometer	Opsys MR	Dynex, Chantilly, USA
Präzisionsbrutschrank	B 15	Memmert, Schwabach
Präzisionswaage	analytic, A 200S	Sartorius, Ratingen
Reine Werkbank	Laminar Air, TL 2448	Heraeus, Osterode
Sauerstoffmessgerät	Oxycom D 25	Dräger, Lübeck
Sauerstoffmessgerät	Oxycom D 100	Dräger, Lübeck
Schüttelwasserbad	Modell 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler	Mikrotiter Shaker	Dynatech, Denkendorf
Software für Videokamera	VidCap	Microsoft, Unterschleißheim
Standzentrifuge	Minifuge RF	Heraeus, Osterode
Statistikprogramm	SPSS 12.0 für Windows	SPSS, Chicago, USA
Stereolupe	Stemi 2000-C	Zeiss, Oberkochen
Stereolupe	Stemi SV 8	Zeiss, Oberkochen
Strichkreuzmikrometer	Okular W 25x / 10	Zeiss, Oberkochen
Thermomixer	comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	ULP	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 103H	Bandelin, Berlin
Videokamera	Handycam 2006i	Sony, Köln
Vortex	VF2	Janke&Kunkel, Staufen
Wasserstrahlpumpe	aus Plastik	Merck Eurolab, Darmstadt

4.3 Tiere

4.3.1 Ratten

Für die *Whole Embryo Culture* (WEC) wurden Rattenembryonen des Auszuchtstammes Wistar-Unilever (HsdCPb:WU, Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) verwendet. Die nulliparen Muttertiere hatten ein Gewicht zwischen 180 und 220 g. Die Rattenböcke wurden jeweils für 1 Jahr im Tierstall gehalten und zur Verpaarung herangezogen.

4.3.2 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Tierschutzrichtlinien des Landes Berlin. Die Tiere wurden unter SPF Bedingungen in vollklimatisierten Räumen (Temperatur: $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$) in Makrolon[®]-Käfigen in Gruppen von fünf bis acht weiblichen Tieren gehalten. Die Rattenböcke wurden einzeln gehalten. Sowohl Futter (Teklad Global 2018, Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon) als auch Wasser (Leitungswasser) stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Ein künstlicher, über das Jahr konstanter Tag–Nacht–Rhythmus mit einer Lichtperiode von 12 Stunden wurde durch eine automatische Beleuchtungsanlage gewährleistet.

4.3.3 Verpaarung

Für die Verpaarung wurden zwei nullipare weibliche Ratten in den Käfig der Männchen für einen Zeitraum von zwei Stunden verbracht. Der Vollzug eines Deckaktes wurde anhand der Prüfung des Vorhandenseins eines Vaginalpfropfes bzw. anhand eines Vaginalabstrichs geprüft. Der Nachweis des Vaginalpfropfes bzw. von Spermien wurde als positiver Befund gewertet. Die Mitte der Verpaarungszeit galt bei diesem Verfahren als Stunde Null der Trächtigkeit [50].

4.3.4 Organentnahme

Am Gestationstag 9,5 wurden die Embryonen den Muttertieren entnommen, nachdem diese durch Dekapitation mit einem Dekapitator (Modell 130, Harvard Apparatus, March-Hugstetten) getötet waren. Die Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen oder Geweben war beim Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) durch die Arbeitsgruppe Klug des Institutes angezeigt. Die Genehmigungsnummern lauteten: T 0295/97 bzw. T 0201/03.

4.4 Begasung der Kulturgefäße bzw. Vorbegasung der Kulturmedien

Vor dem Einsetzen der Embryonen in die Kulturmedien wurden die Kulturgefäße mit einem Gemisch von 10 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂ und 85 Vol % N₂ bei einem Strömungsvolumen von 8 l/min für 3 min begast. Die Begasung diente zur Erniedrigung des herstellungsbedingten hohen pH-Werts von 8,0 bis 8,5 (Messung des Labors) in den physiologischen Bereich (auf pH 7,4). Nach dem Einsetzen der Rattenembryonen in die Kulturgefäße (t = 0 h) wurden diese erneut mit einem Gemisch von 10 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂ und 85 Vol % N₂ bei einem Strömungsvolumen von 5 l/min für 3 min begast. Nach 36 Stunden Kultur erfolgte eine erneute Begasung der Kulturflaschen mit einem Gasgemisch von 50 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂ und 45 Vol % N₂ bei einem Strömungsvolumen von 5 l/min für 3 min.

Die Gasgemische wurden mit einem Gasmischer (KM 60–3 SE SO, Witt–Gastechnik, Witten) aus den einzelnen hochreinen Gasen für medizinische Anwendungen Sauerstoff, Stickstoff Plus 5.0 und Kohlendioxid 2.7 (AGA Gas, Hamburg) hergestellt.

Die Kulturflaschen (Standflaschen Enghals 50 ml, Merck Eurolab, Darmstadt) wurden mit Gummistopfen (20 mm für Standflaschen Enghals 50 ml, Sigma-Aldrich, Taufenkirchen) und Aluminiumkappen (20 mm für Standflaschen Enghals 50 ml, Sigma-Aldrich, Taufenkirchen) verschlossen.

4.5 Inkubationsgerät – Roller

Als Kulturapparatur für die WEC wurde ein speziell angefertigtes Inkubationsgerät basierend auf einen Präzisionsbrutschrank (B 15, Memmert, Schwabach) verwendet. Es gewährleistet eine konstante Inkubationstemperatur von $38,5 \pm 0,2$ °C unter ständigem Rotieren der Kulturflaschen mit 25 U/min.

4.6 Präparationsmedium

Als Medium für die Präparation der Deziduen und der Eizylinder in bakteriologischen Petrischalen (Ø 10 cm, Sigma–Aldrich, Taufenkirchen) wurde Hanks' balancierte Salzlösung (HBSS, ohne Phenolrot, mit 0,35 g/l NaHCO₃, Biochrom, Berlin) verwendet. Die Präparation der Embryonen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.7 Kulturmedien

4.7.1 Serumaufbereitung

Das Auftauen der bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Seren erfolgte stufenweise: in der ersten Stufe bei Raumtemperatur an der Luft bis zur Bildung eines Flüssigkeitsfilmes zwischen festem Serumblock und Gefäßwand, und anschließend unter Erwärmung auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad.

4.7.2 Zusammensetzung des Kulturmediums

Das Kulturmedium setzte sich, unabhängig von den verschiedenen Seren und Serummischungen, grundsätzlich aus einem Serumanteil von 85 % und einem Pufferanteil von 15 % (Hanks' balancierte Salzlösung HBSS, Biochrom, Berlin) zusammen. Testsubstanzen oder Nährstoffsupplemente wurden zunächst in der Salzlösung gelöst, und anschließend in das Kulturmedium eingebracht. Allen Kulturmedien, die auf heterologen Seren (Human- oder Rinderserum) basierten, wurden immer Glukose (D(+)-Glukose, Merck Eurolab, Darmstadt) und Methionin (L-Methionin, Sigma-Aldrich, Taufenkirchen) in Mengen von 1,57 mg Glukose bzw. 75 μg Methionin pro 1 ml Kulturmedium zugesetzt.

4.7.3 Vorbereitung der Kulturflaschen

Die Kulturflaschen (Standflasche, Enghals, 50 ml, Merck Eurolab, Darmstadt) wurden jeweils mit 7 ml des Kulturmediums gefüllt, vorbegast (siehe 4.4) und bis zum Einsetzen der Embryonen im Roller-Inkubator vorgewärmt.

4.8 Präparation des Eizylinders

4.8.1 Präparationstechnik

Innerhalb eines Zeitraumes von 2 Stunden wurden am Tag 9,5 der Trächtigkeit den Muttertieren die Gebärmutter entnommen und in eine Petrischale (\varnothing 10 cm, Sigma-Aldrich, Taufenkirchen) mit Präpariermedium überführt. Unter einer Reinraumwerkbank (Laminar Air Flow T2448, Heraeus, Osterode) wurden die Eizylinder mit den Deziduen aus dem Uterus mit zwei gebogenen Uhrmacherpinzetten (Pinzette nach Dumont, gebogen, 10,5 cm, Martin, Tuttlingen) herauspräpariert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Stereolupe (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen) bei 16- bis 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Embryonen wurden mit geraden Uhrmacherpinzetten (Pinzetten nach Dumont, gerade, 10,5 cm, Martin, Tuttlingen) samt ihren Hüllen von den anhaftenden Anteilen der Gebärmutter Schleimhaut (Dezidua) gelöst. Anschließend wurde die Reichert'sche Membran mit Uhrmacherpinzetten in

zwei Hälften geteilt, die noch am Ektoplazentarkonus fixiert blieben. Die freipräparierten Eizylinder wurden in die WEC eingesetzt.

4.8.2 Auswahl der in die WEC eingesetzten Embryonen

Die zu verwendenden Entwicklungsstadien der Embryonen wurden primär durch das limitierte Zeitfenster der Präparation von 2 Stunden vorgegeben. Hierbei wurden auffällig kleine oder große Embryonen eliminiert. Die verwendeten Entwicklungsstadien gehörten zum Witschi Stadium 14 [33], genauer zum „Frühen Somitenstadium“ [143], bzw. wurden eindeutig charakterisiert durch das Einteilungsschema von Flick et al. [54] (Abb. 4).

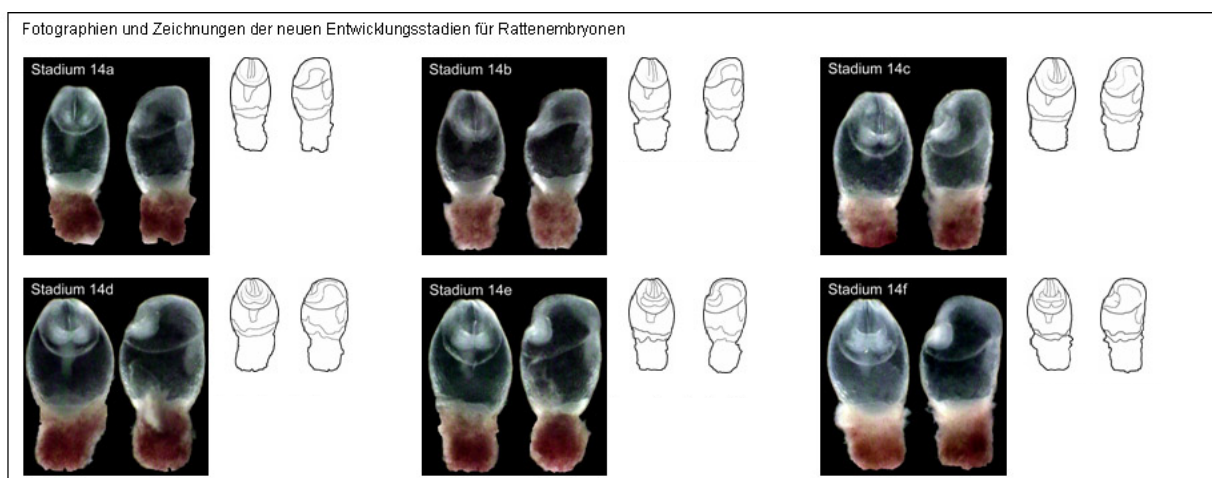


Abb. 4: Einteilungsschema der Entwicklungsstadien der Ratte im frühen Somitenstadium (0 bis 5 Somiten) beobachtbar während des Präparationszeitraums von 2 Stunden am Gestationstag 9,5.

4.8.3 Einbringen der Embryonen in die Kultur

Es wurden jeweils zwei bis vier Embryonen pro Kulturflasche eingesetzt. Die Kulturflaschen wurden wieder verschlossen und anschließend begast (siehe 4.4). Um beim Einsetzen der Rattenembryonen in die Kulturflaschen keine gewichtete Verteilung zu erhalten [144], wurden die Embryonen eines Muttertieres auf verschiedene Versuchsansätze verteilt. Kulturflaschen unterschiedlicher Versuchsbedingungen mussten während der Versuchsdauer alternierend mit Embryonen besetzt werden.

4.9 Auswertung der Embryonen

Nach 48 Stunden Kulturdauer wurden die Embryonen aus jeweils einer Kulturflasche in eine Petrischale (\varnothing 10 cm, Sigma–Aldrich, Taufenkirchen) mit Präpariermedium (HBSS, Biochrom, Berlin) überführt. Die Entwicklung der Embryonen in Kultur wurde durch die Charakterisierung ihres Wachstums und ihres Differenzierungsgrads anhand von jeweils zwei Aus-

wertungsparametern bestimmt [72]. Das Wachstum wurde durch die Messung der Scheitel-Steiß-Länge und die Ermittlung des Gesamtproteingehalts der Embryonen bestimmt. Die Differenzierung der Embryonen wurde durch die Ermittlung der Anzahl der Somiten und des Morphologischen Score-Systems nach Klug et al. [72] erfasst (Abb. 5). Bei der Kultur der Embryonen geht man davon aus, dass die Differenzierung und das Wachstum der Embryonen weitestgehend unabhängige Ereignisse sind, die unabhängig von einander ausgewertet werden können. Für den Fall, dass sowohl die Differenzierung als auch das Wachstum der Embryonen gleichartig (beide positiv oder beide negativ) verändert sind, spricht man auch von der Entwicklung und meint immer gleichzeitig Effekte auf die Differenzierung und das Wachstum.

4.9.1 Auswertungsparameter für das Wachstum

4.9.1.1 Bestimmung von Längenmaßen an den Embryonen

Die Scheitel–Steiß–Länge wurde unter der Stereolupe (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen) mit eingesetztem Strickkreuzmikrometer (W10x/25, Zeiss, Oberkochen) ausgemessen und anhand einer Tabelle in Millimeter umgerechnet. Es wurde die maximale Ausdehnung parallel zur Längsachse des Embryos gemessen. Dieser Parameter konnte nur dann erhoben werden, wenn die Achsendrehung des Embryos vollständig erfolgt war, das heißt die Krümmung über die Bauchseite den Steiß eindeutig sichtbar machte [145].

4.9.1.2 Proteinbestimmung

Es wurde der Gesamtproteingehalt des einzelnen Embryos ohne seine Hüllen mittels der Lowry Methode [146] unter Verwendung des DC-Protein Assays (BioRad, Hercules, USA) bestimmt. Als Vergleichsprotein bei der Ermittlung der Standardkurve wurde bovines Serumalbumin (Paesel + Lorey, Hanau) verwendet.

Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers aus Embryonenhomogenat. Die Überführung der ganzen Embryonen in ein Homogenat wird im Folgenden kurz beschrieben: einzelne Embryonen wurde frei von Präpariermedium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Safe Lock, Eppendorf, Hamburg) verbracht. Um für die Proteinbestimmung im linearen Bereich der Standardkurve der Meßmethode zu bleiben, wurden die unterschiedlich großen Embryonen in verschiedene Volumina des Lösungspuffers (0,5 M Natronlauge, Merck Eurolab, Darmstadt) aufgenommen. Das chemische Auflösen der Embryonen und die Proteinfreisetzung erfolgten durch Inkubation in Natronlauge über Nacht (14 bis 16 Stunden) bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde eine mechanische Zerkleinerung der Embryonen mit einem Laborrührwerk (IKA-RW 15, Junke&Kaukel, Staufen) unter Verwendung eines Homogenisationskegels (Teflonkolben, Merck Eurolab, Darmstadt) in den Reaktionsgefäßen durchgeführt. Eine dreiminütige Ultraschallbehandlung in einem mit Leitungswasser gekühlten Ultraschallbad (Sonorex Super, Bandelin, Berlin) bei einer Temperatur

von ca. 15 °C diente der weiteren mechanischen Zerkleinerung und Proteinfreisetzung. Anschließend wurden die Proben in einem Thermomixer (Comfort, Eppendorf, Hamburg) bei einer Temperatur von 30 °C für 30 Minuten gerüttelt, bevor der Proteingehalt mit Hilfe des Biorad DC-Protein-Assays bestimmt wurde. Die Auswertung erfolgte computergestützt mittels der Auswertungssoftware (Microplate Manager 4.0, Biorad, Hercules, USA).

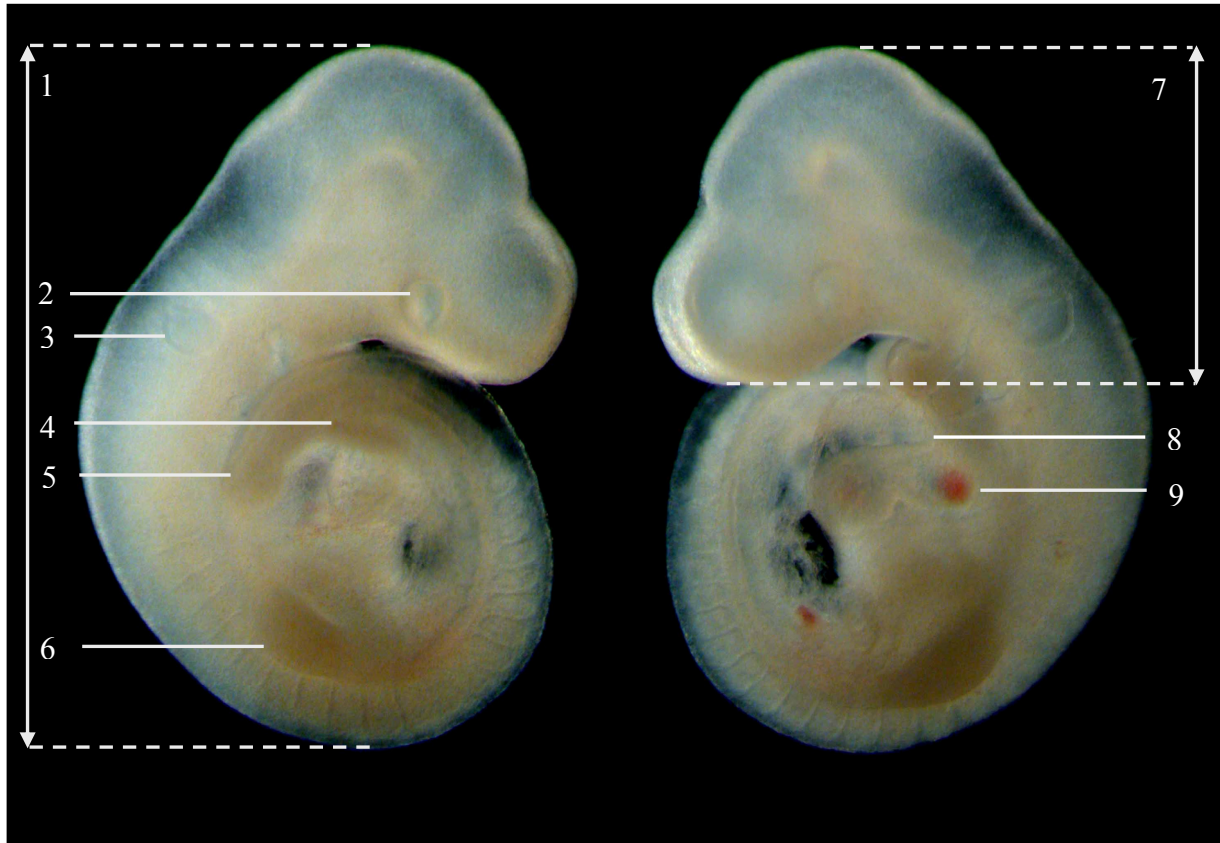


Abb. 5: Morphologisch auswertbare Organanlagen der Rattenembryonen am Ende der Kulturzeit (Gestationstag 11,5)
Markierung der einzelnen Organanlagen oder Regionen, die in der Auswertung berücksichtigt werden: 1 – Scheitel-Steiß-Länge, 2 - Augenanlage, 3 - Ohranlage, 4 - Anlage der hinteren Gliedmaßen, 5 - kaudaler Rumpfabschnitt, 6 - Anlage der vorderen Gliedmaßen, 7 - Kopfregion und 8 - Herzanlage und 9 - Blutbildung.

4.9.2 Auswertungsparameter für die Differenzierung

4.9.2.1 Bestimmung der Anzahl der Somiten

Unter der Stereolupe (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen) wurden die Anlagen der Urwirbel (Somiten) gezählt. Es wurden nur diejenigen blockförmigen Zellaggregate als Somiten gezählt, die sich im Rahmen der Segmentierung durch die Bildung eines Intersegmentalseptums vom paraxialen Mesodermstrang abgrenzen.

4.9.2.2 Beurteilung der Differenzierung der Embryonen mit Hilfe eines Score Systems

Die morphologische Beurteilung der Embryonen erfolgte unter der Stereolupe (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen) mit einer 16- bis 32-fachen Vergrößerung. Für die Erfassung der Diffe-

renzung der Embryonen wurde das morphologische Score-System von Klug et al. [72] verwendet. Es stellt ein Punktsystem für die verschiedenen Entwicklungsstadien von Rattenembryonen im Zeitfenster zwischen dem Gestationstag 10 bis 12 dar. Hierbei werden die folgenden 11 Parameter beurteilt: 1. Blutgefäßsystem des Dottersackes, 2. Haltung des Embryos, 3. Neuralrinne / -rohr, 4. Kopffregion, 5. Augenanlage, 6. Ohranlage, 7. Herzanlage, 8. Anlage der vorderen Gliedmaßen, 9. Anlage der hinteren Gliedmaßen, 10. kaudaler Rumpfabschnitt und 11. Blutbildung. Anhand von definierten Schritten der physiologischen Entwicklung der Embryonen wurde der Entwicklungsstand der einzelnen Organanlagen bzw. der Haltung eingestuft und ein entsprechender Punktwert vergeben. Mit zunehmender Entwicklung der Embryonen erhöhen sich die Punktwerte der einzelnen Organanlagen. Die Summe der resultierenden Punktwerte eines Embryos in diesem Score-System ist umso größer, je weiter die Entwicklung des Embryos fortgeschritten ist. Treten bei den Embryonen Anomalien einzelner Organanlagen auf, die so genannten Dymorphogenesen, werden diese qualitativ und quantitativ erfasst. Anschließend wird die Häufigkeit von Embryonen mit mindestens einer Anomalie innerhalb einer Untersuchungsgruppe ermittelt.

4.9.3 Fotografie der Embryonen

In der ersten Hälfte dieser Arbeit wurden mit einem analogen Fotokamerasystem gearbeitet. Es bestand aus der Fotoapparatur (Stereomikroskop SV8, Aufsetzkamera M-35, dem Winder M und der Belichtungssteuerung MC 63, Zeiss, Oberkochen), einem Stativ mit einer Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott, Wiesbaden) und Kunstlichtdiafilmen (Ektachrom 160, Kodak, Stuttgart). Aufgrund des hohen Zeitaufwandes dieser Methode konnten nicht alle Embryonen fotografisch dokumentiert werden, sondern nur jeweils ein Embryo pro Untersuchungsgruppe. Daraus resultierte, dass nicht immer der repräsentativste Embryo einer Untersuchungsgruppe im Vergleich zu der später ermittelten deskriptiven Statistik der Untersuchungsgruppe fotografiert wurde.

In der zweiten Hälfte wurde ein digitales Fotokamerasystem eingesetzt, was zu einer erheblichen Reduktion des Zeitaufwands führte. Dabei wurde eine Videokamera (Handycam 2006i, Sony, Köln) oder eine Digitalkamera (E995, Nikon, Düsseldorf) direkt an die Stereolupe (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen) angeschlossen. Die digitalen Bilder wurden in einen PC eingelesen und mit dem Grafikprogramm VidCap (Microsoft, Unterschleißheim) archiviert. Zur Bildbearbeitung wurde das Grafikprogramm Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, USA) verwendet.

4.9.4 Methoden der statistischen Auswertung

Die Daten dieser Studie wurden sowohl für die deskriptive Statistik als auch für die analytische Statistik mit dem Statistik-Programm SPSS 12.0 (für Windows, SPSS, Chicago, USA)

bearbeitet. Entsprechend den verschiedenen Variablentypen der Auswertungsparameter wurden unterschiedliche Verfahren angewendet. In der deskriptiven Statistik wurden für die Scheitel-Steiß-Länge, den Proteingehalt der Embryonen, die Anzahl der Somiten und den Morphologischen Score Boxplot-Diagramme gewählt. Anstelle einer Darstellung des Mittelwerts mit der Standardabweichung wurden Boxplot-Diagramme vorgezogen, da diese Darstellungsform eine bessere Wiedergabe der Verteilung der Rohdaten innerhalb einer Messgruppe ermöglicht. Sie stellt eine Fünf-Punkte-Zusammenfassung mit Median, erstem und drittem Quartil, Ausreißern und Extremwerten der Ergebnisse dar. Die Häufigkeit von Embryonen mit Dymorphogenesen innerhalb einer Untersuchungsgruppe bzw. die Ausprägung der Dottersackdurchblutung wurden mit einfachen bzw. gestapelten Balkendiagrammen dargestellt. In der analytischen Statistik wurden für die Scheitel-Steiß-Länge, den Proteingehalt der Embryonen, die Anzahl der Somiten und den Morphologischen Score die Analyse der Varianzen (ANOVA) mit dem Post-Hoc Test Tamhane-2 angewendet. Bei der Dottersackdurchblutung wurde der Mann-Whitney-Test und für die Häufigkeit der Dymorphogenesen der Fischer's Exakte Test angewendet. Der statistische Vergleich erfolgte zur jeweiligen Kontrollgruppe der Versuche; auf Abweichungen hiervon wird explizit hingewiesen. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ (* od. +) bzw. $p < 0,01$ (** od. ++) angenommen.

4.10 Serumgewinnung

Serum stellt die Basis des Kulturmediums der Kultur ganzer Rattenembryonen dar. Im Labor wurden fünf Chargen Rattenserum nach dem Protokoll von New et al. [46], eine Charge Humanserum nach dem Protokoll von Chatot et al. [103] und 19 Chargen Rinderserum nach dem Protokoll von Klug et al. [3] gewonnen. Im Folgenden wird die Herstellung kurz zusammengefasst.

Die Abnahme von Tierblut wurde als Organentnahme beim Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) durch die Arbeitsgruppe Klug des Institutes angezeigt. Die Genehmigungsnummer lautete: O 0419/97.

4.10.1 Gewinnung des Rinderblutes

Als Blutspender wurden Kühe, die unter veterinärmedizinischer Aufsicht in der Klinik für Fortpflanzung (WE 19) des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin gehalten wurden, herangezogen. Die Auswahlkriterien waren ungestörter Gesundheitszustand, Freiheit von Stoffwechselstörungen und keine Arzneimittelbehandlung.

Mit einer Aderlasskanüle (\varnothing 2,0 x 100 mm, Martin, Tuttlingen) wurde das Blut aus der mit einer Staukette gestauten Drosselvene (*Vena jugularis externa*) von den fixierten Tieren entnommen. Es wurden 800 bis 1000 ml Blut pro Tier und Tag gewonnen. Das Blut wurde in Zentrifugengläser (80 ml Duran, Schott, Mainz) abgefüllt.

4.10.2 Gewinnung des Menschenblutes

Als Blutspender wurde ein Mann mit ungestörtem Gesundheitszustand, der nachweislich keine Arznei- und Rauschmittel zu sich nahm, herangezogen.

Mit einer Butterfly-Känüle (\varnothing 1,1 mm, Vacutainer System, Becton Dickinson, Heidelberg) wurde das Blut aus der mit einem Stauschlauch gestauten mittleren Vene der Ellenbeuge (*Vena mediana cubiti*) entnommen. Es wurden an zwei Tagen 100 ml Blut pro Tag gewonnen. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen (50 ml, Sarstedt, Nümbrecht) abgefüllt.

4.10.3 Gewinnung des Rattenblutes

Als Blutspender wurden Wistar-Unilever-Ratten des Auszuchtstammes HsdCPb:WU (Harlan Winkelmann GmbH, Borchen) herangezogen, die zuchtbedingt getötet werden mussten. Die Auswahlkriterien waren ungestörter Gesundheitszustand, Freiheit von Stoffwechselstörungen und keine Arzneimittelbehandlung. Es gab keine Präferenz des Geschlechts. Die Ratten wurden mit Isofluran (Florene, Abbott, Wiesbaden) narkotisiert. Anschließend wurde durch Herzpunktion das Blut bis zum Eintritt des Todes entnommen. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen (15 ml, Sarstedt, Nümbrecht) abgefüllt.

4.10.4 Protokoll der Serumgewinnung

Unabhängig von der Spezies wurde die Serumgewinnung weitestgehend nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Die Zentrifugation des Blutes erfolgte innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme mit einer Standzentrifuge (Minifuge RF, Heraeus, Osterode). Es wurden drei Zentrifugationen mit 1200 rcf für 10 min bei 20 °C durchgeführt. Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde der sich bildende Fibrinpfropf mit Hilfe eines Glasrührstabes (20 cm, Merck Eurolab, Darmstadt) von der Gefäßwand der Zentrifugenröhrchen gelöst. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde die obere Phase, das Serum, in neue Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2000 rcf für 20 min bei 20 °C erneut zentrifugiert. Das klare, bernsteinfarbene Serum wurde in Laborflaschen (mit Gewinde, 100 ml, Schott, Mainz) mittels eines Schüttelwasserbads (Modell 1083, GFL, Burgwedel) bei 56 °C hitzeinaktiviert. Das Rinderserum wurde für 45 min, das Humanserum [103] und das Rattenserum [46] für 30 min erwärmt (Inkubationsdauer nach Erreichen von 56 °C gemessen). Nach 45 Minuten wurde das Serum in einem Eiswasserbad kontrolliert auf Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurde das Rohserum zwei Filtrationsschritten unterzogen: in einem ersten Schritt wurde durch eine Filtermembran mit einer Porengröße von 0,45 μ m (Stericup, Millipore, Eschborn) vorfiltriert, und im zweiten Schritt durch einen Filter der Porengröße von 0,2 μ m (Stericup, Millipore, Eschborn). Das Serum wurde in Aliquots von 20 bis 50 ml portioniert und bei -20 °C gelagert.

4.10.5 Spezielle Serumgewinnungen

4.10.5.1 Extern produzierte Kleinstchargen von Rinderserum

Im ersten Schritt der Optimierung der industriellen Produktion von Rinderserum für die WEC sollte die unabhängige Herstellung von Rinderserum in einem zum Labormaßstab vergleichbaren Volumen von 0,5 l pro Charge untersucht werden. In einer Tierzuchtanlage in Behningen, wurden vier unabhängige Chargen unter tierärztlicher Aufsicht entsprechend der Darstellung aus 4.10.1 und 4.10.4 produziert. Als Spendertiere wurden hierfür nur trächtige Rinder im letzten Drittel der Gestation herangezogen.

4.10.5.2 Extern produzierte Chargen mittlerer Größen von Rinderserum

Im zweiten Schritt zur Optimierung der industriellen Produktion von Rinderserum für die WEC wurde das Volumen vom Labormaßstab mit 0,5 l Rinderserum auf 10 bis 50 l pro Charge erhöht. Ein kommerzieller Rohserumhersteller in Neuseeland (Zulieferer der Biochrom AG) produzierte vier Rinderserum-Chargen entsprechend der Darstellung aus 4.10.1 und 4.10.4 bis zum 4. Zentrifugationsschritt. Die weitere Aufarbeitung des Serums (vgl. 4.10.4) erfolgte durch den Serumhersteller Biochrom AG in Berlin. Als Spendertiere wurden nur trächtige Rinder im letzten Drittel der Gestation herangezogen.

4.11 Grundsätzliches Studiendesign

Jede Versuchsbedingung oder jeder Testansatz wurde an mindestens zwei Versuchstagen in unabhängigen Versuchen untersucht, um einerseits die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, und um andererseits den Stichprobenumfang pro Versuchsbedingung zu erhöhen. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurden die einzelnen Versuche zusammengefasst.

4.12 Versuchsaufbau zur Untersuchung der Seren auf ihr entwicklungsförderndes Potential für die Embryonen *in vitro*

Die verschiedenen Standardkulturmedien, käufliche Seren und Mischungen verschiedener Seren wurden als Basis für ein Kulturmedium nach den Angaben in Abschnitt 4.7 zu einem Kulturmedium weiter verarbeitet. Diese Medien wurden im Vergleich zu einer Kontrolle aus einem zuvor als geeignet beurteilten Kulturmedium untersucht.

4.13 Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses einzelner Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Um mögliche Effekte einzelner Wachstumsfaktoren besser detektieren zu können, wurde die Sensitivität der WEC gegenüber exogenen Faktoren erhöht. Hierfür wurde grundsätzlich

das gleiche Protokoll (siehe Abschnitt 4.3 bis 4.8) der WEC angewendet. Folgende Protokollpunkte wurden jedoch modifiziert:

Es wurden jüngere Embryonen vom Gestationstag 9,0 anstatt 9,5 für die Kultur verwendet, die eine höhere Abhängigkeit von exogenen Faktoren für eine normale Entwicklung haben [99].

Es wurde die Kulturdauer von 48 Stunden auf 72 Stunden verlängert, um die Möglichkeiten zur Manifestation von Effekten zu vergrößern [21].

Zur Berücksichtigung der Alterung der Embryonen während der Kultur wurde das Begasungsschema adaptiert [47;147]. Beim Start der Kultur ($t = 0$ h) wurde mit einem Gemisch von 5 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂, 90 Vol % N₂, nach 24 Stunden mit einem Gasgemisch von 20 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂, 75 Vol % N₂, nach 48 Stunden mit einem Gasgemisch von 50 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂, 45 Vol % N₂ und nach 64 Stunden mit einem Gasgemisch von 85 Vol % O₂, 5 Vol % CO₂, 10 Vol % N₂ gearbeitet. Die Begasung der Kulturflaschen erfolgte jeweils mit einem Strömungsvolumen von 5 l/min für 3 min.

Die Untersuchung der Effekte der verschiedenen Wachstumsfaktoren erfolgte in einem Mangelmedium basierend auf einer heterologen Serummischung (1:1 Mischung von Fötalen Bovinem Serum und Donor Bovinem Serum). Dieses Mangelmedium bedingt eine retardierte Entwicklung der Embryonen. Das Mangelmedium ohne Supplementierung von Wachstumsfaktoren diente als Negativkontrolle. Die Positivkontrolle basierte auf der Serummischung der Negativkontrolle supplementiert mit 10 % Rattenserum, welches eine normale Entwicklung der Embryonen ermöglichte. Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren wurde in Abhängigkeit von deren Konzentration untersucht.

4.14 Molekularbiologische Untersuchungen

Die molekularbiologischen Untersuchungen sollten eine mögliche veränderte Sensibilität embryonaler Strukturen für Wachstumsfaktoren in Kultur aufzeigen. Hierfür wurden Embryonen und ihr Dottersack während der Entwicklungsphase der Organogenese *in vivo* und *in vitro* auf die Expression der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren analysiert. Es sollte geklärt werden, ob die Expression unter den Kulturbedingungen vergleichbar ist zur *In-vivo*-Situation. Darüber hinaus sollte der Einfluss für einen Wachstumsfaktor untersucht werden.

4.14.1 Gewinnung des Probenmaterials

Für die molekularbiologische Untersuchung wurde Untersuchungsmaterial sowohl von *In-vivo*-Embryonen als auch von *In-vitro*-Embryonen eingesetzt. Die *In-vivo*-Embryonen wurden an den Gestationstagen (GD) 10, 11 und 12 nach der in Abschnitt 4.8 angegebenen Präparationstechnik gewonnen. Die *In-vitro*-Embryonen wurden aus der Kultur ganzer Embryonen, gestartet am Gestationstag 9,0, nach 48 (GD 11) bzw. 72 Stunden (GD 12) entnommen. Auf

die Gewinnung von Probenmaterial der *In-vitro*-Embryonen vom Gestationstag 10 wurde verzichtet, da das angewandte RNA-Extraktionsprotokoll (siehe unten) eine Kultivierung unverhältnismäßig vieler Embryonen erfordert hätte.

Der Dottersack wurde von den Embryonen in gekühltem (4 °C) Präpariermedium abgetrennt und ebenfalls für die Isolierung der RNA verwendet.

4.14.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus den Dottersäcken bzw. den Embryonen mit dem TRIZOL-Reagent (Gibco BRL, Karlsruhe) gemäß den Herstelleranweisungen extrahiert. Aufgrund der geringen Mengen an Untersuchungsmaterial wurde jeweils das Material von 4 Embryonen gepoolt verarbeitet.

Die RNA-Integrität wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem 1,5 %-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) kontrolliert. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden durch fotometrische Bestimmung der optischen Dichten bei 260 nm bzw. des Quotienten der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm unter Verwendung eines Küvettenfotometers (UV-VIS 1202, Shimadzu, Duisburg) bestimmt. Die verwendeten RNA-Proben wiesen einen Quotienten der gemessenen OD-Werte von 260 nm zu 280 nm im Bereich von 1,4 bis 1,8 auf.

4.14.3 Synthese der cDNA durch Reverse Transkriptase

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase wurde aus der RNA-Matrize eine DNA-Kette synthetisiert. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA in einem Mastermix (20 µl) bei 21 °C für 10 min, gefolgt von 37 °C für 1 h und 94 °C für 5 min in einem PCR-Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) inkubiert. Der Mastermix bestand aus:

- a) 4 µl 5-fach Reverse-Transkriptase-Puffer,
- b) 1 µl (2,5 pM) Random Hexamer Oligonukleotide,
- c) 1 µl (40 mM) Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs),
- d) 8 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltes (DEPC) Aqua bidest.,
- e) 0,5 µl (2,5 mM) Dithiothreitol,
- f) 0,5 µl (4 U) RNasin und
- g) 1 µl (200 U) MMLV-Reverse Transkriptase (*Moloney murine leukaemia virus*).

Zur Kontrolle der DNA-Kontamination bzw. falsch positiver Banden bei der RT-PCR wurden Negativ-RT-Ansätze durchgeführt, bei denen anstelle der MMLV-Reverse Transkriptase Aqua bidest. eingesetzt wurde.

4.14.4 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis der mRNA-Expression der verschiedenen Targets wurden für die Reaktion 5 µl des RT-Ansatzes (entspricht einer RNA-Menge von 0,5 µg) verwendet. Für die Bestimmung der mRNA-Expression wurden cDNA-spezifische Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, um eine Amplifikation von in Spuren vorhandener genomischer DNA zu verhindern. Als endogener Standard für alle untersuchten cDNA-Proben wurde die Amplifikation von β-Aktin genutzt, für deren Ansatz 2 µl des RT-Produktes (entsprechen einer RNA-Menge von 0,25 µg) eingesetzt wurden.

Alle PCR-Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte:

- a) 2 bzw. 5 µl des jeweiligen RT-Ansatzes
- b) je 0,5 µl (0,2 µM) cDNA-spezifische Primer,
- c) 5 µl 10-fach PCR-Puffer,
- d) 0,5 µl (0,4 mM) dNTPs,
- e) 2 µl (2 mM) MgCl₂,
- f) 0,5 µl (2,5 U) *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase,
- g) 36 µl DEPC-behandeltes Aqua bidest.

Der generelle Amplifikationszyklus umfasst einen einleitenden Denaturierungsschritt bei 94 °C für 30 s, anschließend 28-35 Zyklen (log linear Phase) von 1 min bei der jeweiligen Temperatur für die Primerhybridisierung von 58-60 °C (abhängig von den verwendeten Primer), 30 s Extension bei 72 °C und 30 s Denaturierung bei 94 °C sowie einen abschließenden Syntheseschritt von 6 min bei 72 °C. Die Temperatur der Primerhybridisierung wurde für die einzelnen Transkripte optimiert und betrug für EGF-Rezeptor, Flk-1-Rezeptor sowie VEGF 58 °C und für den IGF-I-Rezeptor 60 °C.

Die amplifizierte cDNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese (Elektrophorese Power Supply ST 606 T, Gibco BRL, Karlsruhe) in einem 1,5 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden nach Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Geldokumentationssystem mit Diana Software, Raytest, Straubenhardt). Als molekulare Massenstandards wurden 100-bp-DNA-Größenmarker verwendet. Kontrollreaktionen zur Aufdeckung von DNA-Kontamination oder falsch positiver Banden wurden durchgeführt, indem (-)RT-Ansätze bzw. DEPC-behandeltes Aqua bidest. bei der RT-PCR eingesetzt wurden. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Grafikanalyseprogramm *Advanced Image Data Analyser* (AIDA – Raytest, Straubenhardt).

4.14.5 Primerdesign und –synthese

Zur Auswahl der Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wurde eine detaillierte Datenbankrecherche nach den publizierten genomischen DNA-, mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen in der „Genbank“-Gendatenbank auf dem Server des „National Centers for Biotechnology“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden danach in das Programm „Primer“ des Softwarepakets des Europäischen Molekularbiologischen Laboratoriums (EMBL) eingelesen. Zur Berechnung der idealen Nukleotidsequenz der Primerpaare wurden folgende Optionen verändert:

- a) mindestens 43 % GC-Basenpaarungen pro Primer,
- b) Schmelztemperatur mindestens 58 °C und maximal 62 °C,
- c) Primerlänge von mindestens 18 und höchstens 22 Basen und
- d) Amplifikatgröße 400-900 Basenpaare.

Die anderen verbindlichen Vorgaben des Softwarepakets zur Spezifikation des Primers wurden akzeptiert. Die vorgeschlagenen Sequenzen wurden automatisch berechnet und mittels der Software „Blast“ des NCBI auf Spezifität, Kreuzreaktivität und Identität geprüft. Ausgeschlossen wurden angebotene Nukleotidsequenzen, bei denen beide Primer zusammen andere Gene als die erwarteten cDNAs erkannten. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Primer-Paare mindestens ein Intron überspannten und so genannte Pseudogene nicht amplifizierten. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Gibco BRL in Karlsruhe.

Im Folgenden sind die Primer-Sequenzen der einzelnen Transkripte (5' → 3' = „sense“ bzw. 3' → 5' = „antisense“) angegeben:

β-Aktin:	5' – TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC – 3'
	3' – GGA TCT TCA TGA GGT AGT CTG TC – 5'
IGF-I Rezeptor:	5' – AGA AAA GGG AAT TTC GTC CC – 3'
	3' – TTT TCT CAA TCC TGA TGG CC – 5'
EGF-Rezeptor:	5' – TGG TCT CGA GGG CTT GGT CT – 3'
	3' – TTT TGA GGC TGA CAC TCG GG – 5'
Flk-1-Rezeptor:	5' – GCA GAC GCT GTC ATG CAC AG – 3'
	3' – TCC CCC CTG GAA ATC CTT C – 5'
VEGF:	5' – AGG CTG CTG TAA CGA TGA AAG – 3'
	3' – TCT TTT TAC ACT GTT CGG CTC – 5'

Ziel der RT-PCR Analysen war die Bestimmung der semiquantitativen RNA Mengen im Vergleich zur RNA-Menge des House-keeping-Gene's β -Aktin im Embryo und im Dottersack. Hiermit sollte ein Vergleich der *In-vivo*-Embryonen bzw. deren Dottersäcke vom Gestationstag 10, 11 und 12 zu entsprechenden *In-vitro*-Embryonen der Gestationstage 11 und 12 ermöglicht werden. Neben der Untersuchung der Rezeptoren wurde auch die RNA Menge des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) bestimmt, da dieser den größten entwicklungsfördernden Effekt als Supplement für ein Mangelmedium aus heterologen Rinderserum hatte. Hierbei sollten Hinweise auf dessen endogene Synthese im Embryo bzw. Dottersack erhalten werden. Mit gleichen Proben wurden Vergleiche der verschiedenen Gestationstage untereinander sowie der entsprechenden *In-vivo*- und *In-vitro*-Materialien miteinander durchgeführt.

4.15 Untersuchungen von Referenzsubstanzen in der WEC

In einem Konzentrationsfindungsversuch mit geringem Stichprobenumfang ($n = 4$ Embryonen) wurde der effektive Konzentrationsbereich der jeweiligen Referenzsubstanz (5-Fluorouracil, Ethanol, Penicillin G, *all-trans* Retinsäure und Valproinsäure) in der WEC unter Verwendung der neu etablierten Kulturmedien ermittelt. Anhand der festgestellten konzentrationsabhängigen adversen Effekte wurde der zu testende Konzentrationsbereich festgelegt, um eine Bestimmung der höchsten Konzentration, die keinen adversen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen hatte (NOAEC), und der niedrigsten Konzentration, die bei allen exponierten Embryonen eine Dysmorphogenese induzierte (IC_{Max}), zu ermöglichen. In einem unabhängigen WEC Versuch wurde dieser Konzentrationsbereich mit einer höheren Stichprobengröße von $n = 8$ bis 48 Embryonen zur genauen Beschreibung der embryotoxischen Effekte untersucht.