2. Material und Methoden

2.1. WEC

Die `Whole Embryo Culture´ (WEC) ist ein *In-vitro*-System, welches u.a. zur Testung von Substanzen auf Embryotoxizität genutzt werden kann. Dabei werden nach der Methode von Klug et al. *(34)* isolierte, intakte Embryonen während einer sehr empfindlichen Zeitspanne ihrer Organogenese in Testansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Die Embryonen werden am Gestationstag 9,5 gewonnen und entwickeln sich für 48 Stunden in einem geschlossenen, rotierenden System bei definierter Temperatur und definiertem Gaspartialdruck. Die embryotoxische Wirkung der Substanzen auf Wachstum und Differenzierung wird anschließend ausgewertet.

2.1.1. Tiere

Es wurden Wistar Ratten (Wistar Unilever, Hsd Cpt:WU) zwischen 180 und 250 g Gewicht verwendet.
Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in vollklimatisierten Räumen unter definierten Bedingungen gehalten. Die Temperatur betrug 22 ± 1°C, die relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5%. Futter (Altromin^{R} 1324) und Wasser aus Nippeltränken standen ad libitum zur Verfügung. Licht- und Dunkelperioden wechselten sich im 12-Stunden-Takt ab. Lichtperioden begannen um 09.00 und endeten um 21.00 Uhr.
Zur Verpaarung wurde ein männliches Tier mit zwei Weibchen zusammengesetzt. Dies konnte zu zwei verschiedenen Zeiten stattfinden: von 04.00 bis 06.00 Uhr oder von 06.00 bis 08.00 Uhr. Diese unterschiedlichen Verpaarungszeiten bedingten dann unterschiedliche Zeitpunkte der Gewinnung der Embryonen. Sie wurden also 9,5 Tage später in der Zeit zwischen 16.00 bis 18.00 oder 18.00 bis 20.00 Uhr gewonnen. Die Limitierung der Verpaarungszeiten auf zwei Stunden minimierte die Schwankungen der Entwicklungsstadien der Embryonen.
Die Weibchen wurden anschließend auf einen vorhandenen Vaginalplaque, in Zweifelsfällen auch auf Spermien im Vaginalabstrich untersucht. Im positiven Falle wurde dieser Tag als Tag 0 der Gestation definiert.
Diese Tätigkeiten übernahmen Tierpfleger des Instituts.

2.1.2. Gewinnung der Embryonen

Am Tag 9,5 – je nach Verpaarungszeit zwischen 16.00 und 18.00 oder 18.00 und 20.00 Uhr – wurden die Ratten durch Dekapitation getötet, entblutet und der Uterus herauspräpariert.
Ab diesem Zeitpunkt wurde unter Reinraumbänken gearbeitet. Die im Folgenden beschriebene Präparation der Embryonen erfolgte in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS):
Der Uterus wurde mit scherenden und ziehenden Bewegungen eröffnet und die Deziduen daraus entfernt. Unter der Stereolupe wurde anschließend der Eizylinder aus der Dezidua gelöst. Dafür wurde der Teil der Dezidua, in dem sich der Embryo nicht befand, durch vorsichtiges Einschneiden unter zu Hilfenahme der Pinzette bis zur Hälfte halbiert und rundherum eingeschnitten. Anschließend wurden die beiden Hälften durch Ziehen voneinander getrennt. In einer Hälfte befand sich dann der Eizylinder, der mit Hilfe einer Pinzette aus der Dezidua geschält wurde. Anschließend wurde die Reichertsche Membran eröffnet und bis zum Ektoplazentarkonus herunter gezogen.

Nach der Präparation lag also der Embryo mit sich entwickelnden Amnion und Dottersack (nur der viszerale Anteil) samt dem Ektoplazentarkonus vor.

2.1.3. Die Kultur

Es wurde nach der Methode von New *(54)* mit Variationen nach Klug et al. *(34;35)* gearbeitet. Variationen betrafen dabei vor allem den Anteil an verwendetem Rattenserum: dieser wurde zu Gunsten von Rinderserum reduziert.
Die Embryonen wurden in die Kulturmedium enthaltenden Kulturflaschen überführt, begast und für zwei Tage inkubiert.
Während dieser Zeit vollzieht sich der Hauptanteil der Organogenese. Es entwickeln sich u.a. die Herz-, Augen- und Ohrenanlage, Kiemenbögen und Gliedmaßenanlagen, und das Neuralrohr schließt sich.

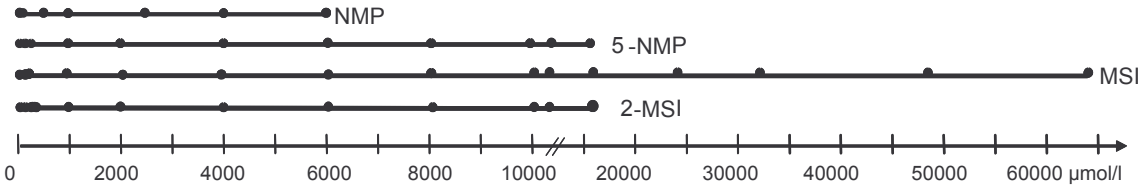
2.1.3.1. Versuchsaufbau

Die vier Testsubstanzen wurden in unabhängigen Versuchsreihen auf Embryotoxizität in der WEC getestet. Zuerst wurden Konzentrationsfindungsversuche und später Konzentrationseffektversuche durchgeführt. Bei ersteren wurde für jede Testsubstanz ein breit gefächertes Konzentrationsfenster gewählt, um den Bereich der effektiven Konzentrationen festzulegen. In den Konzentrationseffektversuchen wurde dann ein engeres Konzentrationsfenster getestet. Dieses erstreckte sich von Konzentrationen, in denen keine negativen Effekte auftraten, bis zur IC_{Max}, d.h. der niedrigsten getesteten Konzentration, in der die Embryonen zu 100% abnorm waren.
Die jeweiligen Versuchsansätze setzten sich dabei aus einer Lösungsmittelkontrolle und Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz zusammen. Probenumfänge für die Testansätze beliefen sich in den Konzentrationsfindungsversuchen auf vier Embryonen je Ansatz und Versuch und in den Konzentrationseffektversuchen auf je acht Embryonen. Die Auswertung der Veränderungen bedingt durch die Testsubstanz erfolgte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, die einen Probenumfang von acht Embryonen hatte. Die Ergebnisse der Konzentrationseffektversuche wurden später zur endgültigen Auswertung zusammengefasst.

2.1.3.2. Kulturmedium

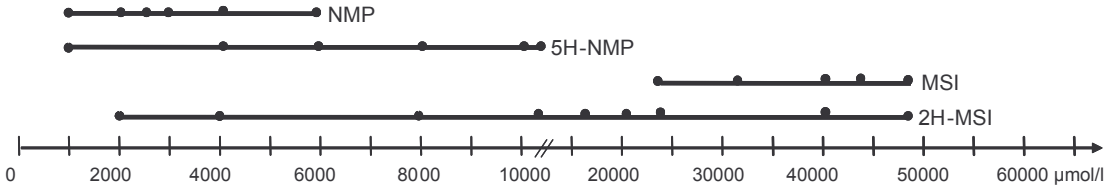
Die Embryonen wurden in Kulturflaschen mit einem Volumen von 50 ml inkubiert. Es wurde stets eine Menge von 7 ml Kulturmedium verwendet. In jede Flasche wurden jeweils vier Embryonen eingesetzt.
Das Kulturmedium bestand aus 85% Serummischung (Serummischung für die WEC, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Katalognummer S9001) und 15% HBSS. Zu den 7 ml Kulturmedium wurden außerdem 1,57 mg Glukose und 0,22 mg Methionin zugefügt.
HBSS wurde verwendet, um die Verdünnungsreihen für die Testansätze herzustellen. Das HBSS der Verdünnungsreihen ersetzte die 15% HBSS im Kulturmedium und wurde den Testansätzen in Form der jeweiligen Verdünnungsstufe und den Kontrollen in reiner Form beigefügt. Im Fall der Retinsäure musste für eine optimale Löslichkeit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet werden.
Es musste sich dabei um eine Konzentration des Lösungsmittels handeln, die nicht negativ mit der Entwicklung der Embryonen interferiert. Für DMSO sollte dabei eine Konzentration von 0,5% nicht überschritten werden. Empfohlen und verwendet wurden 0,1% *(32)*.
Die in den Konzentrationsfindungs- und –effektversuchen getesteten Konzentrationen der Testsubstanzen sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

Abb. 2: Darstellung der getesteten Konzentrationen in den Konzentrationsfindungsversuchen in der WEC



Legende: Darstellung der getesteten Konzentrationen von NMP und seinen Metaboliten in den Konzentrationsfindungsversuchen in Form von Zahlenstrahlen. Die Striche spiegeln die getestete Konzentrationsspanne wider, die Punkte die einzelnen getesteten Konzentrationen (in µmol/l).

Abb. 3: Darstellung der getesteten Konzentrationen in den Konzentrationseffektversuchen in der WEC



Legende: Darstellung der getesteten Konzentrationen von NMP und seinen Metaboliten in den Konzentrationseffektversuchen in Form von Zahlenstrahlen. Die Striche spiegeln die getestete Konzentrationsspanne wider, die Punkte die einzelnen getesteten Konzentrationen (in µmol/l).

2.1.3.3. Einsetzen der Embryonen

Je Kulturflasche wurden vier Embryonen eingesetzt. Bei der Auswahl der Embryonen wurde darauf geachtet, dass keine Verletzungen vorlagen. Um die Streuung der Embryonalstadien so gering wie möglich zu halten, wurde das Einteilungsschema nach Flick et al. *(19)* verwendet. Wenn möglich, wurden nur Embryonen der Stadien a bis c verwendet. Der Eizylinder des Stadiums a zeigt deutlich sichtbare Neuralfalten, bei b sind Vorderdarmbucht und eine Kopffalte zu sehen, bei c - aufgrund der Weiterentwicklung des Rhombenzephalons - eine Vertiefung von dorsal. Embryonen eines Muttertieres wurden möglichst gleichmäßig auf die verschiedenen Ansätze verteilt, so dass in der Regel maximal zwei Embryonen eines Wurfes in eine Kulturflasche eingesetzt wurden. Auf diese Weise wird der so genannten `litter effect´ eines einzelnen Muttertieres vermieden, der bei *In-vivo*-Versuchen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann.

2.1.3.4. Begasung

Für ein adäquates Sauerstoffmilieu - angepasst an das Entwicklungsstadium der Embryonen - war ein Austausch der Gasphase in den Kulturflaschen notwendig. Während der Begasung wurden die Kulturflaschen auf einen Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland, Artikelnummer KS 126 Basic, 0-1100 Upm) bei 100 Upm gestellt, um eine gleichmäßige Verteilung der Gaspartialdrücke in der gasförmigen und in der flüssigen Phase zu erhalten.
Medizinischer Sauerstoff (O_2), Kohlendioxid (CO_2) und Stickstoff (N_2), wurden aus Gasflaschen (Linde AG, München, Deutschland) über Schläuche in eine Gasmischanlage (Firma Witt, Witten, Deutschland, Typ KM 60-3SE SO) geleitet. In dieser wurden die benötigten Volumina gemischt und über einen weiteren, kleineren Schlauch, einen Sterilfilter und eine aufgesteckte Kanüle in die Kulturflaschen geleitet.

Um den pH-Wert des Mediums auf den physiologischen Wert von 7,4 zu senken und die Embryonen gleich schon beim Einsetzen in das notwendige - im Vergleich zur Luftzusammensetzung - sauerstoffärmere Milieu zu überführen, fand eine Vorbegasung des Mediums zwei Stunden vor dem Einbringen der Embryonen in die Kultur statt. Hierzu wurde das Medium 2 Minuten mit 10% O_2, 5% CO_2 und 85% N_2 bei 8 Nl/min begast.
Nach dem Einbringen der Embryonen in die Kulturflaschen wurde 3 Minuten mit 10% O_2, 5% CO_2 und 85% N_2 bei 4 Nl/min begast.
Nach 36 Stunden Kulturdauer wurde für 3 Minuten mit 50% O_2, 5% CO_2 und 45% N_2 bei 4 Nl/min begast.

2.1.3.5. Inkubation
Die Embryonen wurden für 48 Stunden in einem Rollerschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland, Typ B15), der permanent mit 25 Upm und bei einer Temperatur von 38,5 ± 0,3°C bewegt wurde, inkubiert. Der Rollerschrank wurde zur Verwendung für die WEC modifiziert: Es wurde nachträglich eine drehbare horizontale Achse eingebaut. Diese wird von außen über einen Elektromotor angetrieben. Auf die Achse sind drei runde Plexiglasscheiben aufgesteckt. In diese wurden je acht Löcher mit dem Durchmesser der Kulturflaschen gebohrt, in die diese für die Inkubation horizontal eingeklemmt wurden.

2.1.4. Auswertung

Bei der Auswertung wurde die Entwicklung der Embryonen der Testansätze im Vergleich zu der Entwicklung der Embryonen der Lösungsmittelkontrolle bewertet. Erhobene Parameter waren Differenzierungs- und Wachstumsparameter. Zu den Differenzierungsparametern zählen der morphologische Score-Wert und die Somitenanzahl. Zu den Wachstumsparametern zählen die Scheitel-Steiß-Länge und der Proteingehalt je Embryo. Als weiterer Auswertungsparameter wurde die Dottersackdurchblutung herangezogen.
Es wurde darauf geachtet, die Kulturflaschen in der Reihenfolge aus dem Rollerschrank zu nehmen, in der sie auch in diesen verbracht worden sind, um so unterschiedlich lange Kulturzeiten zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte unter einer Stereolupe (Zeiss, Jena, Deutschland, Typ Stemi SC8). Hierzu wurden die Embryonen aus dem Kulturmedium in Petrischalen mit 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung überführt.
Die Blutgefäße des Dottersacks wurden beurteilt und nach einem Score bewertet. Dieser berücksichtigt die Organisation der Blutgefäße. Das Blutgefäßsystem entwickelt sich aus einem scheinbar ungeordneten System zu einem mit gerichtetem Blutfluss bis in kleine Gefäßaufzweigungen hinein. Danach wurden die Embryonen aus dem Dottersack herauspräpariert. Die Somiten wurden ausgezählt und der morphologische Score-Wert wurde bestimmt. Die Somiten wurden nach kranial ab der letzten sichtbaren Trennlinie im Somitenstrang gezählt. Es wurde bis zur kaudalen Ansatzlinie der vorderen Gliedmaße gezählt. Der Somit, der noch ganz unterhalb der vorderen Gliedmaßenanlage lag, war der zwölfte. Das heißt, dass sich die Gesamtzahl der Somiten aus der gezählte Anzahl plus zwölf errechnete.
Verwendet für die Bestimmung des morphologischen Score-Werts wurde das System nach Klug et al. *(34)*, welches eine praktikablere und einfachere Form des Systems nach Brown und Fabro *(10)* darstellt. In dem morphologischen Score-Wert findet sich die Summe der Einzelscore für folgende Parameter wieder: Die Haltung des Embryos, der Stand der Neurulation, die Kopfregion, die Augen-, Ohr- und Herzanlagen, die Anlagen der vorderen und hinteren Gliedmaßen, der kaudale Rumpfabschnitt und die

Blutbildung. Die Entwicklung jedes einzelnen dieser aufgezählten Parameter wurde bewertet und ihr wurde ein entsprechender Zahlenwert zugeordnet. Mit fortschreitender Entwicklung des Parameters steigt dieser Zahlenwert an. Die Summe der Zahlenwerte für die einzelnen Bewertungsparameter stellt den morphologischen Score-Wert dar. Mit steigender Entwicklung des Embryos steigt also auch die Summe des morphologischen Score-Wertes.

Neben der physiologischen Entwicklung des Embryos wurden auch von der Norm abweichende Ausprägungen beurteilt und erfasst. Eine Abnormität ist eine disproportionale Entwicklung einer Organanlage im Vergleich zur Kontrolle oder die abnormale Ausprägung einzelner Gewebemuster. Die Details der Abnormitäten wurden beschrieben und notiert. Über den Bereich, der durch den morphologischen Score-Wert erfasst wurde, hinaus, konnte es zu weiteren und nicht routinemäßig erfassten Abnormitäten von Organanlagen kommen. Diese konnten z.B. im Bereich der Kiemenbögen liegen und wurden separat beschrieben.
Alle Embryonen, die eine oder mehrere Abnormitäten aufwiesen wurden als abnorm beschrieben. Es wurde die Frequenz der abnormen Embryonen je Untersuchungsgruppe angegeben.
Als Qualitätskontrolle wurden die Embryonen der Lösungsmittelkontrollen ausgewertet und mit den historischen Kontrollen des Labors verglichen. Die historischen Kontrollen ergaben eine Abnormitätenrate von 2-3% *(33)*. Es kann methodenbedingt zu einer bestimmten Abnormitätenrate kommen, die abhängig von der jeweiligen Stichprobengröße ist. Wegen der hier verwendeten relativ kleinen Stichprobengröße von etwa 20 Kontrollembryonen bewegt sich eine Abnormitätenrate von bis zu 10% im zu erwartenden Rahmen *(33)*.

Als Wachstumsparameter wurden die Scheitel-Steiß-Länge und der Proteingehalt jedes Embryos bestimmt.
Die Scheitel-Steiß-Länge wurde mit Hilfe eines Okkulometers (Zeiss, Jena, Deutschland, Okular 25x/10) vermessen.
Der Gesamtproteingehalt der einzelnen Embryonen ohne ihre Hüllen wurde mittels der Lowry Methode *(42)* unter Verwendung des DC-Protein Assays (BioRad, Hercules, USA) bestimmt. Als Vergleichsprotein bei der Ermittlung der Standardkurve wurde bovines Serumalbumin (Paesel + Lorey, Hanau, Deutschland) 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 wurden frei von Präpariermedium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 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) 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 unter Verwendung eines Homogenisationskegels in den Reaktionsgefäßen durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in einem Thermomixer 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).

2.1.5. Fotodokumentation

Über einen Aufsatz der Stereolupe für die fotografische Dokumentation mikroskopischer Bilder, wurden die Embryonen mit einer Digitalkamera (Nikon, Tokyo, Japan, Typ E995) bei Durchlicht fotografiert. Von allen vier Embryonen einer Kulturflasche wurde eine Übersichtsaufnahme gemacht (Vergrößerung: x16). Es wurden Einzelaufnahmen typischer Embryonen jedes Testansatzes von rechts, links, *ventral* und *dorsal* gemacht (Vergrößerung x20). Besonderheiten wurden durch Nahaufnahmen dargestellt.

2.1.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS-Programm, Version 12.0. Ab einer Stichprobengröße von fünf Embryonen wurden die Ergebnisse statistisch bewertet.
Als statistische Maßzahl wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung für die Ausprägung der Blutgefäße des Dottersacks, Scheitel-Steiß-Länge, Anzahl der Somitenpaare, morphologischer Score-Wert, und Gesamtproteingehalt gewählt.
Die statistische Analyse erfolgte vergleichend zwischen den Testansätzen und der Kontrollgruppe. Sie wurde für die Dottersackdurchblutung, die Scheitel-Steiß-Länge, die Anzahl der Somitenpaare, den morphologischen Score-Wert und den Gesamtproteingehalt mit dem t-Test durchgeführt.
Das Auftreten abnormer Embryonen wurde sowohl als Absolutzahl als auch prozentual im Verhältnis zu allen Embryonen jedes Testansatzes dargestellt. Der ausgewählte statistische Test ist für diese Maßzahl der exakte Test nach Fisher, weil immer eine Zellbelegung < 5 zu finden ist.
Der statistische Vergleich erfolgte zur jeweiligen Kontrollgruppe der Versuche. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**) angenommen.

2.2. `Whole-immuno-staining´ (WIS) des 2H3-Neurofilaments

Das `Whole-immuno-staining´ (WIS) kann verwendet werden, um mit speziellen Antikörpern bestimmte Strukturen an ganzen Embryonen zu markieren und darzustellen. Die Embryonen werden nach Entfernung ihrer Hüllen fixiert und mit primärem und sekundärem Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist dabei mit einem Enzym gekoppelt, das in einer weiteren Reaktion einen Farbstoff umsetzt. In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein mit Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper eingesetzt. Die Peroxidase reagierte mit dem Farbstoff Naphthol, was zu einer blauen Färbung der markierten Bereiche führte.

Nervenstrukturen können mit Hilfe des 2H3-Neurofilament-Antikörpers dargestellt werden. Der verwendete sekundäre Antikörper war ein Anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt. Das gesamte Protokoll erstreckte sich über vier Tage.

2.2.1. Versuchsaufbau

Um Aussagen über die Entwicklung der Nerven und Ganglien im Kopfbereich machen zu können und ein System zur Auswertung dieser zu entwickeln, wurden Rattenembryonen *ex vivo* an den Gestationstagen 10,0; 11,0; 11,5 und 12,0 gewonnen, mit dem 2H3-Antikörper markiert, angefärbt und ausgewertet. Bei jedem Versuch wurden als Negativkontrollen Embryonen verwendet, die nicht mit primärem,

aber mit sekundärem Antikörper inkubiert wurden, um eventuelle unspezifische Bindungen des Antikörpers ausschließen zu können.

Anschließend wurden Versuche mit Embryonen, die in der WEC kultiviert worden sind, durchgeführt. Ziel war es, mit dem WIS Effekte an den Gehirnnerven durch NMP (N-Methyl-2-pyrrolidon) an grobmorphologisch unveränderten Embryonen zu untersuchen, d.h. einen zusätzlichen sensiblen Endpunkt zu erhalten. Neben der Lösungsmittelkontrolle wurden drei verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz gewählt: Die Embryonen wurden in Testansätzen mit der IC_{NOAEL}, also der höchsten getesteten Konzentration, in der keine negativen Effekte auf die in der WEC erhobenen Parameter beobachtet wurden, inkubiert, außerdem wurden zwei weitere höhere Konzentrationen gewählt, um eventuelle Veränderungen an den Nerven in einer Konzentrationsabhängigkeit darzustellen.
Als Positivkontrolle wurde Ethanol gewählt, da bei Mäusen eine Neurotoxizität von Ethanol nachgewiesen wurde *(16;79)*. Nach dem gleichen Prinzip wie für NMP beschrieben wurden die Konzentrationen von Ethanol ausgewählt.
In zwei unabhängigen Versuchen (sowohl für die WEC, als auch für das WIS) sollte eine Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse gezeigt werden.

2.2.2. Methodik des WIS

Dem Protokoll von Mark et al. *(45)* folgend, wurde die Färbung der Neurofilamente mit dem 2H3-Antikörper (2H3, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA, strain BALB/c, IgG1-Isotyp, Ig-Gehalt: 200 µg/ml), der von Dott et al. *(15)* etabliert wurde, durchgeführt. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde in Vorversuchen mit Hilfe des Western Blot Verfahrens gezeigt. Die Embryonen wurden in 4%igem Paraformaldehyd, gelöst in dd. H_2O, über Nacht bei 4°C fixiert. Sie wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur dehydriert. Dazu wurde Methanol mit Phospate Buffered Saline (PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+}) verdünnt, um folgende Konzentrationen zu erhalten: 25%, 50% und 75%. Die Embryonen wurden je zehn Minuten in jeder Konzentration inkubiert. Anschließend wurden sie in 100% Methanol bei –20°C gelagert.
Die einzelnen Schritte des WIS wurden in kleinen verschließbaren Glasflaschen mit einem Volumen von 5,0 ml durchgeführt. In jeder Flasche wurden entsprechend der Testansätze vier bis acht Embryonen während der verschiedenen Schritte inkubiert.

Nach Entnahme der Embryonen aus dem Methanol folgte ein dreimaliges Waschen in PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}) mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl). Um eine ausreichende Verdünnung beim Waschen zu erreichen, wurden immer 4,5 ml der jeweiligen Waschlösung zugegeben.
Um ein späteres Penetrieren des Antikörpers zu ermöglichen, wurden die Embryonen über Nacht in 4,5 ml 0,1% Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 1%Triton X-100 und 10% fötalem Kälberserum (FCS) in PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Embryonen drei Mal in 1% Triton X-100 und 10% FCS in PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen. Dann wurde eine Mischung aus 100 Teilen 10%igem FCS in PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}) und einem Teil der Ausgangslösung des 2H3-Antikörpers hergestellt. Die Embryonen der Testansätze wurden in 0,5 ml dieser Mischung, die Embryonen der Negativkontrolle in 0,5 ml 10% FCS in PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) überführt. Sie wurden über Nacht auf einem Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland, Artikelnummer KS 126 Basic, 0-1100 Upm) bei 100 Upm und 4°C inkubiert.
Am nächsten Morgen wurden sie drei Mal in 1% FCS in PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen.

Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter Ziegen Anti-Maus-Antikörper (Jackson Immuno Research, West Grove, USA, Artikelnummer 115-035-062, Ig-Gehalt: 200 µg/ml) verwendet. Es wurde eine Verdünnung hergestellt aus 40 Teilen 1% FCS in PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}) und einem Teil der Ausgangslösung des Antikörpers. Alle Embryonen wurden in 0,5 ml der Verdünnung über Nacht auf einem Schüttler bei 100 Upm und 4°C inkubiert.
Am nächsten Morgen wurden sie drei Mal in 1% FCS in PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen.
Die nun folgenden Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 100 Upm durchgeführt.
Drei verschiedene Lösungen wurden angesetzt.

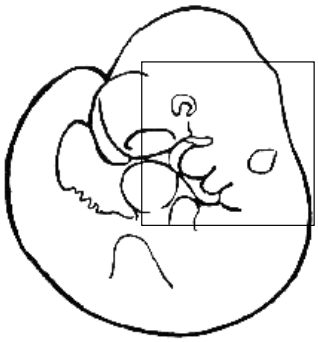
- Lösung A: 20 mg 4-Chloro-1-Naphthol (Sigma, St. Louis, USA, Artikelnummer C88905G) wurden in 200 µl reinem Ethanol gelöst. 0,1% Triton X-100 wurde in 50 ml 0,1M Tris-Salzsäure (Tris-HCl) (eingestellt auf einen pH von 7,6) gegeben. Die 4-Chloro-1-Naphthol-Lösung wurde tropfenweise in das Tris-HCl gegeben. Die Mischung wurde durch einen Faltenfilter gefiltert. Die Embryonen wurden in je 3 ml der Mischung für 15 Minuten inkubiert.
- Lösung B: 4 mg 4-Chloro-1-Naphthol wurden in 40 µl reinem Ethanol gelöst. Die 4-Chloro-1-Naphthol-Lösung wurde tropfenweise zu 10 ml 0,1M Tris-HCl (eingestellt auf einen pH von 7,6) gegeben. Die Mischung wurde durch einen Faltenfilter gefiltert. Die Embryonen wurden drei Mal in je 1 ml der Mischung für jeweils zehn Minuten inkubiert.
- Lösung C: 25 mg 4-Chloro-1-Naphthol wurden in 4 ml reinem Ethanol gelöst. Es wurden 6 ml destilliertes Wasser dazu pipettiert. Kurz vor Gebrauch wurden 200 µl eines Stocks aus 30%igem H_2O_2 1:100 verdünnt in dd. H_2O zugeben. Die Embryonen wurden in je 1 ml der Mischung für sechs Minuten inkubiert.

Die vier auszuwertenden Nerven mussten für eine ausreichende Färbung deutlich als Ganglien und zugehörige Nervenbündel sichtbar sein. War dies nicht der Fall, wurden die Embryonen noch mal in der Lösung C inkubiert, bis alle Strukturen deutlich sichtbar waren. Diese Nachfärbung sollte eine Zeitspanne von weiteren sechs Minuten nicht überschreiten, um ein zu starkes Abdunkeln der Embryonen zu vermeiden.
Gestoppt wurde die Färbereaktion mit 0,05%igem Tween in PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}). In dieser Lösung wurde die Auswertung der Embryonen vorgenommen. Hierzu wurden diese durch Auskippen der Glasflaschen in Petrischalen überführt. Nach der Auswertung wurden die Embryonen wieder in die Glasflaschen zurück verbracht. Um die Aufbewahrung vorzubereiten und die Färbung so gut wie möglich erhalten zu können, wurden die Embryonen erst für zehn Minuten in einer 50:50-Mischung Glycerol/Ethanol belassen und anschließend in 100% Glycerol bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3. Auswertung

Zur Auswertung herangezogen wurde das Nerven-Score-System von Maele-Fabry et al. *(77;79)*. Es wurde für die Anwendung auf Rattenembryonen leicht modifiziert und erweitert. Dabei wurden einzelne Bewertungsparameter genauer und eindeutiger definiert. Subjektive Ausdrücke wie „gut entwickelt“, „dickes Faserbündel“ oder „dünne Wurzel“ wurden genauer umschrieben, um eine objektivere Bewertung zu ermöglichen. Zusätzliche Score-Werte wurden nicht hinzugefügt. Bewertet wurde der Entwicklungsstand des Nervus trigeminus (V), des Nervus facialis (VII), des Nervus glossopharyngeus (IX) und des Nervus vagus (X). Im Folgenden wird eine Aufschlüsselung des Nerven-Scores gegeben. Die Zeichnungen sind Ausschnitte dieses schematisch dargestellten Embryos (Skizze 1):

Skizze 1: Embryo *ex vitro* am Tag 12,0



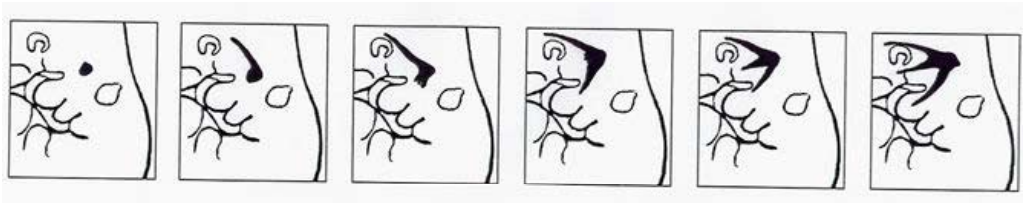
Embryo entnommen und modifiziert aus Van Maele-Fabry et al. *(79)*.

Der Nerven-Score:

Nervus trigeminus (V):

1 = Ganglion ohne abzweigende Fasern (Skizze 2 a)
2 = Aus dem Ganglion wachsen einige Fasern zu einem ersten Bündel des Nervus opthalmicus zusammen (Skizze 2 b)
3 = Ganglion mit Nervus ophthalmicus und einigen einzelnen Fasern nach ventral (Skizze 2 c)
4 = Ganglion mit Nervus ophthalmicus und Nervus mandibularis (Skizze 2 d)
5 = Ganglion mit drei Abzweigen: Nervus ophthalmicus, Nervus mandibularis und Nervus maxillaris (Skizze 2 e)
6 = Ganglion mit drei Abzweigen. Die Nervi mandibularis und maxillaris sind über die Ansatzlinie der Kiemenbögen hinausgewachsen, der Nervus ophthalmicus ist mindestens auf Höhe des Auges (Skizze 2 f)

Skizze 2: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus trigeminus



a b c d e f

Legende: Ausschnitt eines Embryos entnommen und modifiziert aus Van Maele-Fabry et al. *(79)*.

Nervus facialis (VII):

1 = Ganglion mit einigen Fasern nach ventral (Skizze 3 a)
2 = Ganglion mit einigen Fasern nach ventral, die bis an die Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens reichen (Skizze 3 b)
3 = Ganglion mit einigen Fasern nach ventral, die über die Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens reichen (Skizze 3 c)
4 = Ganglion mit einigen Fasern nach ventral, die über die Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens reichen. Etwas dorsal der Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens bilden sich Fasern, die nach kranial in Richtung des ersten Kiemenbogens wachsen (Skizze 3 d)

Skizze 3: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus facialis

a b c d

Legende: Ausschnitt eines Embryos entnommen und modifiziert aus Van Maele-Fabry et al. *(79)*.

Nervus glossopharyngeus (IX):

1 = Wenige ventrale Fasern (Skizze 4 a)

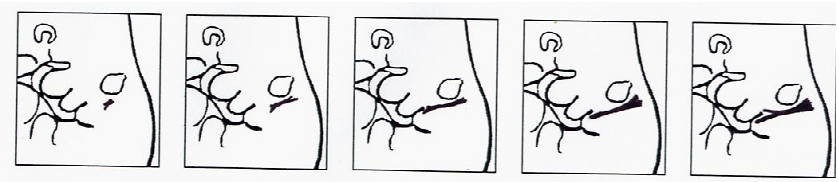
2 = Dorsal der ventralen Fasern ist eine dünne dorsale Wurzel zu sehen. Sie besteht aus zwei bis drei einzelnen Bündeln (Skizze 4 b)

3 = Dünne dorsale Wurzel aus zwei bis drei einzelnen Bündeln mit ventralen Fasern, die über die Ansatzlinie der Kiemenbögen reichen (Skizze 4 c)

4 = Ventrale Fasern reichen über die Ansatzlinie der Kiemenbögen. Die dorsale Wurzel ist gut entwickelt, d.h. sie hat ein kompaktes Aussehen und es sind mehr als drei Faserbündel zu erkennen bzw. einzelne Bündel sind nicht mehr zu erkennen (Skizze 4 d)

5 = Die dorsale Wurzel ist gut entwickelt, die ventralen Fasern reichen über die Ansatzlinie der Kiemenbögen und ein abzweigendes Faserbündel in Richtung des zweiten Kiemenbogens ist zu sehen (Skizze 4 e)

Skizze 4: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus glossopharyngeus



a b c d e

Legende: Ausschnitt eines Embryos entnommen und modifiziert aus Van Maele-Fabry et al. *(79)*.

Nervus vagus (X):

1 = Ganglion mit unorganisierter dorsaler Wurzel, d.h. dass die dorsale Wurzel ein gepunktetes Aussehen hat (Skizze 5 a)

2 = Ganglion mit gut organisierter dorsaler Wurzel sichtbar, d.h. dass in der dorsalen Wurzel die Fasern zielgerichtet erscheinen und nur wenige Quervernetzungen aufweisen. Ventral des Ganglions ist ein schmales Faserbündel (Skizze 5 b)

3 = Gut organisierte dorsale Wurzel und ventral des Ganglions ist ein dickes Faserbündel, d.h. dass dieses gleich dick oder dicker als das Ganglion ist (Skizze 5 c)

Skizze 5: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus vagus

a b c

Legende: Ausschnitt eines Embryos entnommen und modifiziert aus Van Maele-Fabry et al. *(79)*.

2.2.4. Fotodokumentation

Die Methodik der Fotodokumentation entsprach derjenigen, die für die Bilder aus der WEC angewandt wurde (siehe Kapitel 2.1.5.). Es wurden Fotos von beiden Seiten der Embryonen gemacht (Vergrößerungsbereich zwischen x16 bis x25). Details wurden teilweise vergrößert aufgenommen.

2.2.5. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS-Programm, Version 12.0.
Dargestellt wurden die absoluten und prozentualen Anteile der Embryonen aus einer Gruppe, die denselben Nerven-Score aufwiesen.
Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test für den Nerven-Score. Ab einer Stichprobengröße von fünf Embryonen wurden die Ergebnisse statistisch bewertet.
Das Auftreten abnormer Embryonen wurde sowohl als Absolutzahl als auch prozentual im Verhältnis zu allen Embryonen jedes Testansatzes dargestellt. Der ausgewählte statistische Test ist für diese Maßzahl der exakte Test nach Fisher, weil immer eine Zellbelegung < 5 zu finden ist.
Der statistische Vergleich erfolgte zur jeweiligen Kontrollgruppe der Versuche. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ (*) bzw.$p < 0,01$ (**) angenommen.

2.3. `Whole-immuno-staining´ (WIS) der Neuralleistenzellen

Die Neuralleistenzellen können mit Hilfe des Antikörpers gegen das zelluläre Bindungsprotein der Retinsäure (CRABP-I-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA, Artikelnummer SC-10061, Ig-Gehalt: 200 µg/ml) dargestellt werden. CRABP-I wird vor allem von Neuralleistenzellen und Hinterhirnzellen exprimiert *(62)*, *(24)*,*(14)*.
Das gesamte Protokoll erstreckte sich über fünf Tage. Die ganzen Embryonen (ohne ihre Hüllen) wurden für drei Tage mit primärem, anschließend für 20 Stunden mit dem sekundärem Antikörper – in diesem Fall Anti-Ziegen-Antikörper der Maus, Peroxidase-gekoppelt – inkubiert. Nach Markierung der Neuralleistenzellen setzte die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase den Farbstoff Naphthol um, was zu einem blauen Präzipitat führt.

2.3.1. Versuchsaufbau

Um Aussagen über die Wanderung der Neuralleistenzellen (NCCs) im Kopfbereich unter Kontrollbedingungen machen zu können, wurden Rattenembryonen *ex vivo* am Gestationstag 10,5 gewonnen, mit dem CRABP-I-Antikörper markiert, angefärbt und ausgewertet. Bei jedem Versuch wurden Negativkontrollen mit Embryonen mitgeführt, die nicht mit primärem, aber mit sekundärem Antikörper inkubiert wurden, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers auszuschließen. Die Spezifität des CRABP-I- Antikörpers wurde in Vorversuchen mit Hilfe des Western Blot Verfahrens gezeigt.

Anschließend wurden Versuche mit Embryonen, die in der WEC kultiviert worden sind, durchgeführt. Ziel war es, mit dem WIS Effekte an den Neuralleistenzellen induziert durch NMP (N-Methyl-2-pyrrolidon) an morphologisch unveränderten Embryonen zu beobachten. Neben der Lösungsmittelkontrolle wurden drei verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz gewählt: Die Embryonen wurden in Testansätzen mit der IC_{NOAEL}, also der höchsten getesteten Konzentration, in der keine negativen Effekte auf die in der WEC erhobenen Parameter beobachtet wurden, inkubiert, außerdem wurden zwei weitere höhere Konzentrationen gewählt, um eventuelle Veränderungen an den Neuralleistenzellen in einer Konzentrationsabhängigkeit darzustellen.
Als Positivkontrolle wurde Retinsäure gewählt, da Effekte von Retinsäure auf die Wanderung der Neuralleistenzellen nachgewiesen wurden *(40;85)*. Nach dem gleichen Prinzip wie für NMP beschrieben wurden die Konzentrationen der Retinsäure ausgewählt.
In zwei unabhängigen Versuchen (sowohl für die WEC, als auch für das WIS) sollte eine Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse gezeigt werden.

2.3.2. Methodik des WIS

Die Färbung wurde modifiziert nach dem Protokoll von Clouthier et al. *(13)* durchgeführt. Clouthier et al. verwendeten diese Methodik für einen Antikörper gegen das Neurofilament NF-160. Andere Autoren verwendeten sein Protokoll für die Markierung des CRABP-I-Moleküls (u.a. Wei et al. *(81)*). Als Substrat für den Farbstoffumsatz wurde in der hier vorgelegten Arbeit anstatt DAB (Diaminobenzidin) 4-Chloro-1-Naphthol gewählt.
Die Embryonen wurden in 4%igem Paraformaldehyd, gelöst in dd. H_2O, über Nacht bei 4°C fixiert. Sie wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur dehydriert. Dazu wurde Methanol mit PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) verdünnt, um folgende Konzentrationen zu erhalten: 25%, 50% und 75%. Die Embryonen wurden je 10 Minuten in jeder Konzentration inkubiert. Anschließend wurden sie in 100% Methanol bei –20°C gelagert.
Die Schritte des WIS wurden alle in kleinen verschließbaren Glasflaschen mit einem Volumen von 5,0 ml durchgeführt. In jeder Flasche wurden vier bis acht Embryonen während der verschiedenen Schritte inkubiert.

Die Embryonen wurden nach dem Auftauen für fünf Stunden in 4,5 ml 5% H_2O_2 in reinem Methanol bei Raumtemperatur gebleicht, um eine Penetration des Antikörpers zu erleichtern. Es wurde eine Emulsion aus PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) mit 2% fettarmer Milch und 0,5% Triton X-100 hergestellt. Diese Emulsion wurde als PBSMT *(13)* bezeichnet und für die weiteren Schritte verwendet. Die endogene Peroxidase wurde zwei Mal je eine Stunde mit 4,5 ml PBSMT bei Raumtemperatur geblockt. Es wurde eine Verdünnung hergestellt aus 20 Teilen PBSMT und einem Teil der zugesandten

Ausgangslösung des CRABP-I-Antikörpers (Santa Cruz, Santa Cruz, USA, Artikelnummer SC-10061, Ig-Gehalt: 200 µg/ml). Die Embryonen der Testansätze wurden in 0,5 ml dieser Mischung, die Embryonen der Negativkontrolle in 0,5 ml PBSMT überführt. Sie wurden über Nacht auf einem Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland, Artikelnummer KS 126 Basic, 0-1100 Upm) bei 100 Upm und 4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden sie drei Mal für je eine Stunde in PBSMT bei 4°C gewaschen. Um eine ausreichende Verdünnung beim Waschen zu erreichen, wurden 4,5 ml der jeweiligen Waschlösung in die Glasflaschen gegeben. Dann wurde eine Verdünnung hergestellt aus 50 Teilen PBSMT und einem Teil der zugesandten Ausgangslösung des sekundäre Antikörpers – Peroxidase gekoppeltes Maus Anti-Ziegen-Ig (Sigma, St. Louis, USA, Artikelnummer A 5420, Ig-Gehalt: 7,3 mg/ml). Alle Embryonen wurden in 0,5 ml dieser Verdünnung über Nacht auf einem Schüttler bei 100 Upm und 4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden sie drei Mal für je eine Stunde in PBSMT bei 4°C gewaschen. Dann wurden sie für fünf Minuten mit 0,1% Triton X-100 und 0,2% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS (Ca^{2+}/Mg^{2+}) bei Raumtemperatur gewaschen, um überschüssigen Antikörper an das Albumin zu binden.

Die nun folgenden Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 100 Upm durchgeführt.
Drei verschiedene Lösungen wurden angesetzt.

- Lösung A: 20 mg 4-Chloro-1-Naphthol (Sigma, St. Louis, USA, Artikelnummer C88905G) wurden in 200 µl reinem Ethanol gelöst. 0,1 % Triton X-100 wurde in 50 ml 0,1M Tris-Salzsäure (Tris-HCl) (eingestellt auf einen pH von 7,6) gegeben. Die 4-Chloro-1-Naphthol-Lösung wurde tropfenweise in das Tris-HCl gegeben. Die Mischung wurde durch einen Faltenfilter gefiltert. Die Embryonen wurden in je 3 ml der Mischung für 15 Minuten inkubiert.
- Lösung B: 4 mg 4-Chloro-1-Naphthol wurden in 40 µl reinem Ethanol gelöst. Die 4-Chloro-1-Naphthol-Lösung wurde tropfenweise zu 10 ml 0,1M Tris-HCl (eingestellt auf einen pH von 7,6) gegeben. Die Mischung wurde durch einen Faltenfilter gefiltert. Die Embryonen wurden drei Mal in je 1 ml der Mischung für jeweils zehn Minuten inkubiert.
- Lösung C: 25 mg 4-Chloro-1-Naphthol wurden in 4 ml reinem Ethanol gelöst. Es wurden 6 ml destilliertes Wasser dazu pipettiert. Kurz vor Gebrauch wurden 200 µl eines Stocks aus 30%igem H_2O_2 1:100 verdünnt in dd. H2O zugeben. Die Embryonen wurden in je 1 ml der Mischung für sechs Minuten inkubiert.

Die drei Neuralleistenzell-Stränge aus den Rhombomeren 2, 4 und 6 mussten als Beleg einer ausreichenden Färbung deutlich sichtbar sein. War dies nicht der Fall, wurden die Embryonen noch mal in der Lösung C inkubiert, bis alle Strukturen deutlich sichtbar waren. Diese Nachfärbung sollte eine Zeitspanne von weiteren sechs Minuten nicht überschreiten, um ein zu starkes Abdunkeln der Embryonen zu vermeiden.

Gestoppt wurde die Färbereaktion mit 0,05%igem Tween in PBS (mit Ca^{2+}/Mg^{2+}). In dieser Lösung wurde die Auswertung der Embryonen vorgenommen. Hierzu wurden diese durch Auskippen der Glasflaschen in Petrischalen überführt. Nach der Auswertung wurden die Embryonen wieder in die Glasflaschen zurück verbracht. Um die Aufbewahrung vorzubereiten und die Färbung so gut wie möglich erhalten zu können, wurden die Embryonen erst für 10 Minuten in einer 50:50-Mischung

Glycerol/Ethanol belassen und anschließend bei Raumtemperatur in 100% Glycerol gelagert.

2.3.3. Auswertung

Bei jedem Embryo sollten die Wanderungswege der Neuralleistenzellen aus den Rhombomeren 2, 4 und 6 beschrieben werden und im Speziellen wurde auf die neuralleistenzellfreien Räume zwischen den Strängen geachtet. Die Wanderung der NCCs der Embryonen aus den Testansätzen wurde mit der der Embryonen aus der Lösungsmittelkontrolle verglichen.

2.3.4. Fotodokumentation

Die Methodik der Fotodokumentation entsprach derjenigen, die für die Bilder aus der WEC angewandt wurde (siehe Kapitel 2.1.5.). Es wurden Fotos von beiden Seiten der Embryonen gemacht (Vergrößerungsbereich zwischen x16 bis x25). Details wurden teilweise vergrößert aufgenommen.