

Aus dem Institut für Anatomie und Embryologie

(Prof. Dr. med. C. Viebahn)

im Zentrum Anatomie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zu Zellteilung und Zellbewegung
während der Gastrulation des Säugers
mittels Multiphotonenmikroskopie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tobias Reupke

aus

Salzgitter-Bad

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Viebahn

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Ahmed Mansouri

3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der Gastrulation für die embryonale Entwicklung . . .	1
1.2	Zellteilung und Zellbewegung im Vorfeld der Gastrulation	2
1.3	Lebendzellbeobachtung und -manipulation im Embryo	3
1.4	Das Kaninchen als Modellorganismus	4
1.5	Fragestellung	5
2	Methoden	7
2.1	Embryonengewinnung und Färbung	7
2.2	Mikroskopische Untersuchungen	7
2.3	Fluoreszenzmikroskopie und Laserrastermikroskopie	8
2.4	Laserablation einzelner Zellen im Gewebeverband	8
3	Diskussion der Ergebnisse	33
3.1	Bedeutung und Grenzen des DIC	33
3.2	Einfluss der DNS-Färbung	33
3.3	Einfluss der Laserrastermikroskopie	34
3.4	Zellbewegungen und Gastrulation	35
3.5	Mitosen und Primitivstreifenbildung	36
3.6	Experimentelles Potential der Zellablation	36
3.7	Beitrag zum Verständnis der Gastrulation	37
4	Zusammenfassung	39
5	Literaturverzeichnis	40

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Gastrulation für die embryonale Entwicklung

Die Gastrulation beschreibt eine Phase der Entwicklung, in der es zu weitreichenden Veränderungen der äußeren Form und des inneren Aufbaus des Embryos kommt. Wachstum und Differenzierung wirken zusammen, um den noch einfach strukturierten Embryo auf engstem Raum umzuformen. Aus einer annähernd runden, zweischichtigen Keimscheibe, bestehend aus dem Epiblasten und dem Hypoblasten, entsteht innerhalb von wenigen Stunden die dreiblättrige Keimscheibe mit den Keimblättern Mesoderm, Endoderm und Ektoderm (e.g. Stern 2004). Hierbei wird der bisherige Hypoblast durch das mit dem Mesoderm aus dem Epiblast entstehende Endoderm verdrängt (vgl. Sulik et al. 1994, Lawson und Schönwolf 2003). Dieser Vorgang findet im Primitivstreifen statt, einer Verdichtung der Epiblastzellschicht im hinteren (und zukünftigen kaudalen) Anteil des Embryos. Der Primitivstreifen breitet sich entlang der Mittelachse über die hintere Hälfte der Keimscheibe aus und bildet an seinem vorderen (und zukünftig kranialen) Pol den sogenannten Primitivknoten: Hier erfolgt die Bildung des Mesoderms aus Zellen des Epiblasten im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition, indem die Epiblastzellen ihre Zellkontakte auflockern und in den Zwischenraum zwischen Ektoderm und Endoderm migrieren (vgl. Shook et al. 2002).

Mit Ausbildung des Primitivstreifens von kaudal nach kranial und mit der Schichtung in drei Keimblätter wird die Achsendifferenzierung des Embryos unwiderruflich. Diese Ausbildung der Schichten und der Achsen des Embryos bildet später die Grundlage für die Entwicklung von definitiven Organanlagen. So entstehen zum Beispiel im weiteren Verlauf der Entwicklung Muskelzellen aus Zellen des Mesoderms, die Epidermis der Haut und das Nervensystem aus dem Ektoderm sowie die Epithelien von Atmungs- und Verdauungstrakt aus dem Endoderm. In diesem frühen Prozess der Differenzierung verlieren Zellen das Potential für eine weitere variable Entwicklung und passen sich in den Bauplan des Gesamtorganismus ein (vgl. Lawson und Pedersen 1987, Tam und Beddington 1987, Beddington 1982).

1.2 Zellteilung und Zellbewegung im Vorfeld der Gastrulation

Das Auftreten von Zellteilungen mit spezifischer Ausrichtung zu den embryonalen Achsen im Rahmen der Gastrulation (*Oriented Cell Division* = OCD) wurde zuerst bei der Krabbe *Sicyonia ingentis* gefunden (Hertzler und Clark 1992) und später auch beim Zebrafisch *Danio rerio* (engl.: *zebrafish*) nachgewiesen (Concha und Adams 1998). Nachweise von OCD im Embryo des Huhns *Gallus gallus* (Wei und Mikawa 2000) wurden in ihrer mutmaßlichen Bedeutung für die Gastrulation in mathematischen Modellen durchaus angezweifelt (Bodenstein und Stern 2005). In weiteren experimentellen Arbeiten konnte aber wiederum für den Zebrafisch gezeigt werden, dass die OCD im Rahmen der Gastrulation für 60% der Längenzunahme des Embryos verantwortlich ist (Gong et al. 2004). Dieses geschah über die Blockade des Signalwegs der „ebenen Zellpolarität“ (*Planar Cell Polarity* = PCP (vgl. Komiyama und Habas 2008)) und führte zur Reduktion der Längenzunahme von Faktor 1,5 auf 1,2 im Vergleich zum Ausgangswert (Gong et al. 2004). Somit wurde die Relevanz einer Verbindung zwischen OCD und PCP-Signalweg für die Gastrulation nachgewiesen. Für das Auftreten der OCD und eine mögliche Bedeutung im Rahmen der Gastrulation der Säugetiere gibt es bisher jedoch keine Daten.

Die Rolle von Zellbewegungen bei der Gastrulation des Säugerembryos ist ebenfalls ungeklärt. Dadurch fehlen wichtige Informationen für die Interpretation der bisher beobachteten Vorgänge. Mit mehr Wissen um das Ausmaß von Zellbewegungen könnte sich die Interpretation von Genexpressionsmustern deutlich ändern, denn der zeitliche Abstand zwischen einer veränderten Genexpression und der daraus folgenden Änderung der Zelleigenschaften würde bei ausgeprägten Zellbewegungen auch einen räumlichen Abstand bedingen. Die Steuerung der Mesodermentwicklung in der Epiblastschicht durch den darunterliegenden Hypoblasten (Idkowiak et al. 2004) zeigt beispielhaft, wie sich räumlich auseinanderliegende Zellen gegenseitig beeinflussen. Hierbei verändern sich die Zelleigenschaften der Epiblastschicht im Sinne der bereits beschriebenen epithelial-mesenchymalen Transition (vgl. Wang et al. 2010). Für diese Vorgänge existieren weder genaue Zeitmessungen noch sind diese experimentell ohne Weiteres möglich, da es bisher kein Verfahren zur Echtzeitanalyse von Genexpressionsmustern für dieses Anwendungsfeld gibt.

Insgesamt wird deutlich, dass für das Verständnis von steuernden Mechanismen die direkte Beobachtung der dynamischen Abläufe nötig ist. Ein gutes

Beispiel für Erkenntnisse, die nur durch derartige Untersuchungen gewonnen werden konnten, ist die sogenannte *Convergent Extension* (sinngemäß: „Verlängerung durch Zusammenziehen“). Diese wurde zuerst nach Untersuchungen mit statischen Methoden postuliert (Keller et al. 1985), ihr genauer Ablauf und der Beitrag zur Formung des gesamten Embryos konnten jedoch erst mit direkten Beobachtungsmethoden überzeugend dargestellt werden (vgl. Tada und Heisenberg 2012).

1.3 Lebendzellbeobachtung und -manipulation im Embryo

Mit dem differentiellen Interferenzkontrast (DIC, Nomarski 1957) steht eine Methode zur Lebendzellbeobachtung zur Verfügung, die keine spezielle Vorbereitung der Gewebe benötigt. Sie erlaubt die Darstellung von Zellgrenzen und subzellulären Strukturen wie Zellkern und Chromosomen mit dem Nachteil einer eingeschränkten Schärfentiefe, die sich besonders bei gewölbten Präparaten bemerkbar macht. Die Anwendung des DIC für die Darstellung der Keimscheibe im Rahmen von Vorversuchen zeigte zunächst vielversprechende Ergebnisse: Es war möglich, die Oberflächenstruktur von großen Arealen darzustellen und die Konturen einzelner embryonaler Zellen zu verfolgen. Da die Bildgebung mit DIC keine Färbung benötigt und auch keine weitere Manipulation am Embryo voraussetzt, ist sie geeignet, Bewegungsmuster unverfälscht zu dokumentieren.

Die Laserrastermikroskopie beruht auf dem Abrastern eines Präparats mit einem fluoreszenzinduzierenden Laserstrahl und der Aufnahme der Signale durch einen Detektor. Für die LRM stehen die 1-Photonen (1-p-LRM) und die 2-Photonen-Technik (2-p-LRM) zur Verfügung. Bei der 1-p-LRM wird ein Laser mit einer Wellenlänge analog zur konventionellen Anregung (beispielsweise ein ultravioletter Laser zur Anregung blauer Fluoreszenz) genutzt. Bei der 2-p-LRM hingegen erfolgt die Fluoreszenzanregung über die simultane Absorption von zwei Photonen mit längerer Wellenlänge (zum Beispiel aus dem Infrarotbereich bei Anregung blauer Fluoreszenz). Die für diesen Effekt benötigte hohe Beleuchtungsintensität wird durch die Verwendung von gepulsten Lasern erreicht (vgl. Denk et al. 1990). Diese Laser emittieren ihre Strahlung mit hoher Intensität über jeweils sehr kurze Zeiträume (im Fall des hier verwendeten Lasers 80 Millionen Impulse zu je 140 Femtosekunden pro Sekunde, siehe Herstellerangaben der Fa. Coherent, Dieburg, Deutschland). Dieses führt zu einer Lasereinwirkung in etwa 0,001% der Beobachtungszeit. Trotz einer zu-

nächst gering erscheinenden Leistungsabgabe bis etwa zwei Watt wird somit eine hohe Energie zeitlich in den einzelnen Impulsen konzentriert, die durch das optische System räumlich weiter fokussiert werden. In Kontrast zur hohen Intensität der Einzelimpulse weist die 2-p-LRM aufgrund der beschriebenen Anregungsspezifität einen sehr geringen Einfluss auf vitales Gewebe auf (vgl. Dedov et al. 2001, Haraguchi et al. 1999).

Die Anregungsspezifität der 2-p-LRM in Kombination mit der hohen Energiedichte kann jedoch auch für die Erzeugung von eng umrissenen Schäden im Gewebe genutzt werden. So gibt es für den Embryo der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* Untersuchungen zur Abtragung ganzer Zellen und die Wirkungen auf die weitere Entwicklung (e.g. Chang und Keshishian 1996, Montell et al. 1991). An fixierten Präparaten konnte gezeigt werden, dass durch Laserstrahlung im nahen Infrarotbereich mit hoher Präzision subzelluläre Strukturen geschädigt werden können (Heisterkamp et al. 2005).

Für die Fluoreszenzbildgebung mittels Laserraster-Mikroskopie kommen verschiedene Verfahren für die erforderliche Vorbereitung des Embryos in Betracht. Die Einschleusung von fluoreszierenden Proteinen in zur Bildgebung ausreichenden Maße (vgl. Gong et al. 2004) ist bisher als transgene Variante oder via mRNS-Elektroporation nur für die gängigen Modellorganismen etabliert. Für andere Modellorganismen muss daher eine alternative vorbereitende Färbung der zu untersuchenden Embryonen erfolgen. Mit den Kernfarbstoffen DAPI und Hoechst33342 stehen zwei häufig benutzte Kernfarbstoffe zur Verfügung (vgl. Wilson et al. 1990, Lalande et al. 1981). Ferner ist für Hoechst33342 bekannt, dass bestimmte Zellpopulationen die Fähigkeit zur Exkretion des Farbstoffs besitzen (vgl. Mitsutake et al. 2007).

1.4 Das Kaninchen als Modellorganismus

Aus der Perspektive der Humanmedizin kommt der Aussagekraft von Untersuchungsergebnissen mit Bezug zur menschlichen Frühentwicklung eine besondere Bedeutung zu. Für die Maus *Mus musculus* als zur Zeit bedeutendster Säugetier-Modellorganismus liegen zwar zahlreiche Untersuchungen für die Phase der Gastrulation vor (e.g. Perea-Gomez et al. 2001, Lawson et al. 1991, Yen et al. 2009), jedoch sind die hier gewonnenen Ergebnisse aufgrund der großen morphologischen Unterschiede zwischen dem becherförmigen Eizylinder der Maus und der flachen Keimscheibe des Menschen nicht ohne Weiteres übertragbar.

Durch seine Ähnlichkeit zum menschlichen Embryo in der Phase der Gastrulation ist das Kaninchen *Oryctolagus cuniculus* für die Suche nach embryonalen Entwicklungsmechanismen dagegen eher geeignet. Die Ergebnisse bezüglich Ablauf der Gastrulation und Differenzierung haben augenscheinlich eine deutlich stärkere Aussagekraft bezüglich der menschlichen Entwicklung als solche, die an Organismen mit abweichender Morphologie gewonnen wurden. Ein weiterer nicht zu unterschätzender Aspekt ist die Nutzung des Kaninchens für umwelt- und pharmakotoxikologische Untersuchungen. Die beim Kaninchen erhobenen Daten zur embryologischen Entwicklung können somit auch wichtige Normalbefunde für embryotoxikologische Untersuchungen von potentiellen Schadstoffen definieren (e.g. Cai XY 2014, Szalek E 2013). Zwar ist die Beobachtung der embryonalen Entwicklung des Kaninchens *in vivo* seit langem möglich (Waddington und Waterman 1933, Daniel und Olson 1966) und auch in jüngerer Zeit etabliert (Viebahn 2002, Idkowiak 2004), jedoch wird sie insgesamt noch selten verwendet. Möglicherweise aufgrund der seltenen Verwendung des Kaninchens in der Embryologie existieren bisher keine gebräuchlichen Verfahren zur Lebendzellfärbung und -bildgebung für die Keimscheibe im Verbund mit der Blastozyste (Viebahn 2004).

1.5 Fragestellung

Um ein besseres Verständnis für die Vorgänge im Rahmen der Gastrulation mit Blick auf die menschliche Entwicklung zu erreichen, muss ein Verfahren für die Lebendzellbeobachtung an einem säugertypischen Modellorganismus entwickelt werden. Mit diesem Verfahren könnte den vorliegenden Hinweisen auf Migration und Proliferation aus statischen Untersuchungsmethoden (vgl. Viebahn 2002) im Rahmen der Bildung von Meso- und Endoderm im Kaninchenembryo nachgegangen und das mögliche Auftreten von orientierter Zellteilung untersucht werden. Als Farbstoffe für die Multiphotonenmikroskopie sollen in der vorliegenden Arbeit zunächst gebräuchliche DNS-Farbstoffe auf ihre Eignung zur Färbung des Kaninchenembryos im Kulturmedium untersucht und die anschließende Entwicklung der Embryonen beobachtet werden. Hierbei soll parallel eingeschätzt werden, ob aufgrund der bekannten Unterschiede in den Färbecharakteristika weitere nutzbare Effekte bei der Anwendung am Embryo auftreten.

Nach Entwicklung eines adäquaten Färbeprotokolls soll geprüft werden, unter welchen Bedingungen die Embryonen mit Laserrastermikroskopie unter-

sucht werden können. Dabei soll auch die Wirkung auf die kurzfristige Entwicklung begutachtet werden und eine mögliche Schädigung anhand von Gewebeeränderungen in histologischen Präparaten, aber auch durch Beobachtung der morphologischen Entwicklung des gesamten Embryos bewertet werden. Im Rahmen der Laserrastermikroskopie soll in Nebenversuchen erstmalig getestet werden, ob einzelne Zellen eines zweischichtigen Säugerembryos durch Laserstrahlung unter Schonung des Zellverbandes und der Blastozyste zerstört werden können.

Die entwickelten Beobachtungsverfahren sollen schließlich genutzt werden, um Zellbewegungen und Zellteilungen im unmittelbaren Vorfeld der Gastrulation der Säugetiere zu dokumentieren. Aufgrund der vorliegenden Daten aus anderen Modellorganismen und den Voruntersuchungen am Kaninchen liegt der Schwerpunkt hierbei in der Suche nach gerichteter Zellteilung, langstreckiger Zellwanderung sowie einfachen und komplexen Zellbewegungen.

2 Methoden

Es folgt eine zusammenfassende Darstellung der verwendeten Methoden. Für weiterführende Details, Referenzen und Bezugsquellen sei auf die beiden Originalarbeiten dieser Dissertation (siehe Kapitel 3) verwiesen.

2.1 Embryonengewinnung und Färbung

Die Arbeiten mit Kaninchen sind der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen unter dem Aktenzeichen T 20/10 angezeigt. Vor der Verpaarung erfolgt die hormonelle Stimulation der Weibchen zur sogenannten Superovulation. Dieses erhöht die spätere Embryonenausbeute und verringert unter den Aspekten Tierschutz und Ökonomie die Anzahl der zu tötenden Tiere. Am 6,2 Tag nach Empfängnis werden die trächtigen Weibchen durch intravenöse Injektion von Pentobarbital getötet. Anschließend wird die Bauchhöhle eröffnet und die Uterushörner werden entfernt; aus diesen werden dann mit Kulturmedium die noch nicht implantierten Blastozysten herausgespült und in Kultur genommen.

Mit den Farbstoffen DAPI und Hoechst33342 werden die Verdünnungs- und Zeitreihen der Färbeversuche in Kulturmedium bei 37°C und unter fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre durchgeführt. Abschließend werden die Blastozysten in Formalinlösung umgesetzt und damit der Färbezustand fixiert. Bei der Vorbereitung der Lebendzellbeobachtung werden die Blastozysten in frisches Kulturmedium umgesetzt, um den Färbevorgang zu beenden und die Inkubation fortzuführen.

2.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die Blastozysten werden in einer Petrischale mit dünnem Glasboden auf einer Stahlunterlegscheibe positioniert und mit der Keimscheibe nach unten ausgerichtet. Die Petrischale wird anschließend in der Inkubationskammer des inversen Mikroskops platziert. Die Nutzung einer Schale mit Glasboden verfeinert die in der Arbeitsgruppe bereits verwendete Technik, verbessert die Bildqualität im DIC und ermöglicht die Lasermikroskopie. Mittels DIC im Durchlichtverfahren kann nun ohne weitere Vorbereitungen der Embryo untersucht und Zeitrafferaufnahmen der Keimscheibe angefertigt werden. Durch den Glasboden, welcher in seiner Dicke etwa einem üblichen Objektträger-Deckgläschen

entspricht, wird die Bildgebung mit bis zu 630-facher Vergrößerung mit Ölimmersion und dem damit verbundenen geringen Arbeitsabstand ermöglicht. Die Bildschärfe und der Kontrast bessern sich jedoch auch bei schwächeren Vergrößerungen deutlich. Die Bildgebung im DIC erwies sich jedoch rasch als unzureichend für das initial angestrebte Projekt einer vollständigen Kartierung der Zellbewegung innerhalb einer Keimscheibe. Die für eine einzelne Zelle erreichbare Beobachtungszeit ist nicht ausreichend (Reupke et al. unveröffentlicht), denn in den erstellten Zeitrafferaufnahmen können die Zellkonturen nicht durchgängig verfolgt werden. Dadurch sind die sicher dokumentierbaren Bewegungsumfänge für eine valide Auswertung zu gering.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie und Laserrastermikroskopie

Der Färbeerfolg im Rahmen der Färbereihen wird mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Für die Lebendzellbeobachtung erfolgen die Versuche mit dem inversen Laserrastermikroskop TCS SP 2 der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) ausgestattet mit einstellbarem Infrarot-Laser und fest eingestelltem Ultraviolett-Laser der Fa. Coherent (Dieburg, Deutschland). Die Glasbodenschale mit dem Embryo wird hierbei vergleichbar mit der DIC-Mikroskopie in der Inkubationskammer des Laserrastermikroskops positioniert.

2.4 Laserablation einzelner Zellen im Gewebeverband

Für die gezielte Zerstörung von Zellen der Keimscheibe wird das vergrößerungsstärkste Objektiv (63-fach) des TCS SP 2 verwendet. Mit der Steuerungssoftware wird die Intensität des Infrarotlasers auf 1,6 Watt erhöht und die Zahl der zu akquirierenden Pixel minimiert. Durch die Tiefenfokussierung wird eine Rasterebene im Inneren eines Zellkerns gewählt und mit hoher Frequenz abgetastet. Diese Abrasterung binnen Sekundenbruchteilen führt durch die Anregungsspezifität der 2-p-LRM nur im Gebiet der Fokussierung zu einer Energieabsorption im Gewebe.

Anteile der Autoren an den Originalarbeiten

Tracing and ablation of single cells in the mammalian blastocyst using fluorescent DNA staining and multi-photon-laser microscopy

Reupke T, Püschel B, Viebahn C (2009)

Histochem Cell Biol 131(4) 521-530

Digital Object Identifier: 10.1007/s00418-008-0548-y

In der ersten Originalarbeit konnte gezeigt werden, dass die Färbung der Kaninchenembryonen sowohl mit DAPI als auch mit Hoechst33342 verlässlich möglich ist. Die Färbung mit DAPI zeigte hierbei eine Präferenz für die extraembryonalen Zellen mit im Vergleich schwächerer, aber homogenerer Färbung der embryonalen Zellen. Für Hoechst 33342 zeigte sich eine deutlich inhomogenere Färbung aller Zellpopulationen. Die Färbungen mit beiden Farbstoffen zeigten keinen *in vitro* feststellbaren negativen Einfluss auf die kurzfristige Entwicklung über 24 Stunden. Die 1-p-LRM führte jedoch zu massiven Schäden im Embryo und ist daher nicht geeignet zur Bildgebung. Im Vergleich hierzu zeigte die 2-p-LRM eine geringe Schädigung der Embryos im beobachteten Areal mit dosisabhängig zunehmendem Auftreten von Kerneinschlusskörperchen und Verdickung der Epiblastzellschicht. Die kurzfristige morphologische Entwicklung des gesamten Embryos wurde durch die 2-p-LRM nicht beeinflusst. Mit modifizierten Einstellungen für die 2-p-LRM konnten einzelne Zellkerne der Keimscheibe gezielt geschädigt und später in hochauflösender Semidünnschnitttechnik einzelne nekrotische Zellen mit intaktem umstehenden Zellverband identifiziert werden.

Die Anteile der Autoren an dieser Publikation verteilen sich wie folgt: TR führte die Färbereien und Entwicklungsbeobachtungen durch und entwickelte das Protokoll zur Bildgebung in der Lasermikroskopie. TR und PB führten die Experimente zu Zellschädigung und LRM durch und werteten Semidünnschnitte aus. TR, PB und CV planten und organisierten die Versuche und fertigten das Manuskript an.

Planar cell movements and oriented cell division during early primitive streak formation in the mammalian Embryo

Halacheva V, Fuchs M, Dönitz J, Reupke T, Püschel B, Viebahn C (2011)
Dev Dyn 240(8) 1905-1916
Digital Object Identifier: 10.1002/dvdy.22687

In dieser zweiten Originalarbeit konnten die entwickelten Protokolle für die Färbung und die 2-p-LRM genutzt werden. Bisher unbekannte Bewegungsmuster (*L-Turns*, *U-Turns* und *Processional Cell Movement*) konnten mit den komplementären Methoden DIC und 2-p-LRM sicher und valide nachgewiesen und die mögliche Bedeutung für die Ausbildung des Primitivstreifens dargestellt werden. Die bereits im DIC beobachteten Mitosen konnten nun mit der 2-p-LRM im gesamten Embryo verlässlich beobachtet und vermessen werden. Durch die sichere Darstellung der Zellkerne war eine flächendeckende Dokumentation der Bewegungsmuster und des Mitosenablaufs möglich. Mit statistischen Verfahren konnte die bevorzugte Ausrichtung der Metaphaseplatten entlang der A-P-Achse nachgewiesen und der mögliche Einfluss auf die Erhöhung der Zelldichte im Primitivstreifen im Vorfeld der Gastrulation gezeigt werden. Zellbewegungen waren über eine Dauer von 120 Minuten anhand der Zellkerne zu verfolgen, und es zeigten sich L- und U-förmige Zellbewegungen und komplexe Bewegungen wie das *Processional Cell Movement*. Im Primitivstreifen konnte anhand von aus der Schärfeebene austretenden Zellkernen die epithelial-mesenchymale Transition direkt aufgezeichnet werden.

Die Anteile der Autoren an dieser Publikation lassen sich wie folgt zusammenfassen: TR führte Vorversuche für die Aufnahmen mit Nomarski-Kontrast durch wertete diese statistisch aus. VH (mittlerweile verheiratete Stankova) führte anhand der durch TR erarbeiteten Protokolle die definitiven Aufnahmen mit 2-p-LRM und Nomarski-Kontrast durch. PB half bei den Versuchen mit der 2-p-LRM. MF und JD führten die endgültige statistische Auswertung durch und erstellten in Absprache mit VH, TR und CV geeignete Grafiken zur anschaulichen Darstellung. VH, TR, PB und CV planten und organisierten die Versuche. VH, PB, CV, MF und JD fertigten gemeinsam das Manuskript an.

3 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit besonders auch im Kontext aktueller Forschungsergebnisse einer kurzen Wertung unterzogen werden.

3.1 Bedeutung und Grenzen des DIC

In den vorliegenden Untersuchungen bestätigte sich letztlich die Nützlichkeit des DIC für die Bildgebung im Rahmen eines begrenzten Anwendungsfeldes in der Embryologie. Die Möglichkeit der Gewebekonstrastierung ohne vorhergehende Färbung oder gar Fixierung erklärt die weit verbreitete Verwendung der Methode für die Darstellung isolierter Zellen und früher Entwicklungsstadien von Zygote bis Morula (Wu et al. 2012) oder für einzelne Aufnahmen von späteren Embryonalstadien (vgl. Markwald et al. 1977, Kimmel et al. 1995); jedoch sind keine den unseren gleichenden Versuche publiziert. Unter Berücksichtigung der tendenziellen Nichtveröffentlichung von Negativergebnissen ist durchaus anzunehmen, dass bereits andere Autoren an dieser Stelle die Grenzen der vermeintlich einfachen DIC-Mikroskopie erkennen mussten. Insgesamt stellt der DIC jedoch wegen den auch in der 2-p-LRM nicht zu vermeidenden Zellschädigungen eine wichtige Komplementärmethode dar (vgl. Jessen 2012) um zeitlich und örtlich begrenzte Bewegungsmuster ohne den möglichen Einfluss von Färbeverfahren zu dokumentieren. In der zweiten Originalarbeit konnten so die mit der 2-p-LRM am präparierten Embryo flächendeckend nachgewiesenen Bewegungs- und Teilungsmuster mit denen im unpräparierten Embryo verglichen werden.

3.2 Einfluss der DNS-Färbung

Die Arbeiten zeigen erstmals die Färbung lebendiger Embryonen mit DAPI und Hoechst33342 und vergleichen diese bezüglich ihrer Färbecharakteristika. Wie bei der Färbung von lebenden Hefe- und HeLa-Zellen (Haraguchi et al. 1999) zeigten sich auch im Embryo Unterschiede in der Affinität von Hoechst33342 zu den verschiedenen Zellen. Die letztlich intensivere Färbung der Zellkerne durch Hoechst33342 im Vergleich zu DAPI in einer gleichartigen Zellpopulation war für die Lebendzellbeobachtung im Embryo jedoch nicht von

Vorteil. Vielmehr ermöglichte die deutlich homogenere Färbung mit DAPI eine sichere Darstellung aller Zellkerne für die Verfolgung in der LRM.

Aufgrund der unauffälligen Entwicklung der Keimscheiben bis zur Bildung des Primitivstreifens (am Ende der möglichen Inkubationszeit) dürfen die mit der 2-p-LRM gewonnenen Daten zur Zellbewegung und Zellteilung als valide betrachtet werden. Die Mikroskopie mit DIC sichert die Ergebnisse weiter ab, da sie ohne Färbung dieselben Bewegungsmuster zeigt. Gerade in Anbetracht der Interaktion der Farbstoffe mit der DNS (vgl. Wilson et al. 1990, Lalande et al. 1981) war die unauffällige Entwicklung des Embryos nach den DNS-Färbungen erfreulich. Hier bleibt jedoch unklar, ob die physiologische Entwicklung über die beobachteten 24 Stunden in Kultur hinaus stattfinden würde. Eine Methode zur längerfristigen Kultivierung der Kaninchenblastozysten befindet sich zur Zeit in Entwicklung (Püschel, persönliche Mitteilung) und sollte zur Klärung dieser Frage beitragen. Ein weiterer Schritt zur Feststellung einer möglichen Schädigung von genetischer/molekularer Ebene wäre auch der Abgleich von Genexpressionsmustern der Normalentwicklung (Idkowiak et al. 2004) mit denen von Embryonen nach Kernfärbung und anschließender Inkubation über 24 Stunden.

3.3 Einfluss der Laserrastermikroskopie

Durch Auswertung von Semidünnschnitten bestrahlter Embryonen konnte anhand der Anzahl von Kerneinschlusskörperchen und einer Verdickung der Zellschichten die Dosisabhängigkeit der Schädigung im Rahmen der 2-p-LRM gezeigt werden. Durch die deutlich stärkere Ausprägung dieser Veränderungen bei der 1-p-LRM ist die 2-p-LRM die eindeutig vorzuziehende Methode. Beispielsweise zeigte sich bei der Aufnahme von 140 Bildern in ausreichender Qualität binnen 140 Minuten mit 2-p-LRM nahezu keine Zunahme der Anzahl von Kerneinschlusskörpern im Vergleich zur normalen Entwicklung in Kultur. Ein eindeutiger Grenzwert für die maximale unschädliche Bestrahlungsdosis in der 2-p-LRM konnte in dieser Arbeit zwar nicht bestimmt werden, jedoch lassen die verwendeten Surrogatparameter eine ausreichende Einschätzung der Schädigung zu. Die unauffällige morphologische Entwicklung des Embryos deutet ebenfalls darauf hin, dass valide Daten zur Bildung des Primitivstreifens gewonnen wurden. Dieses gilt zumindest für den kurzen Beobachtungszeitraum und ohne Berücksichtigung einer möglichen Schädigung auf genetischer Ebene.

Die optimale Lösung für die Bestimmung des genauen Schadensausmaßes und gegebenenfalls eines Grenzwertes wäre sicher der quantitative Nachweis von oxidativen DNS-Schäden (Hartwig et al. 1996). Mit dieser Methode konnte zum Beispiel für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Beleuchtungsdosen die dosisabhängige Schädigung der DNS durch oxidativen Stress an einzelnen Zellen gezeigt werden (Ge et al. 2013). Die Anwendung dieser Verfahren am Embryo würde jedoch einen hohen Aufwand für die exakte Präparation der bestrahlten Zellen und deren Untersuchung verlangen, ohne dass gewährleistet ist, dass die gewonnenen Ergebnisse hilfreich für die Optimierung der Bildgebung wären. Daher ist das genaue Ausmaß der DNS-Schäden für die Validität der Ergebnisse zunächst weniger bedeutend als die Beobachtung einer physiologischen Entwicklung über einen möglichst langen Zeitraum nach Färbung und Bestrahlung.

3.4 Zellbewegungen und Gastrulation

Die Ergebnisse decken sich dem Prinzip nach mit den postulierten Bewegungsmustern (vgl. Viebahn et al. 2002), auch wenn die erwarteten Zellbewegungen über längere Strecken nicht gefunden wurden. Die Untersuchungen mit DIC-Mikroskopie und LRM führten vielmehr zur Entdeckung und Beschreibung von bisher nicht bekannten Bewegungsmustern von Zellen im frühen Kaninchenembryo. Analog zu der bereits bekannten *Convergent Extension* konnte mit dem *Processional Cell Movement* eine neue Form der Zellinteraktion dargestellt werden, welche gemeinsam mit der Proliferation geeignet ist, eine Formveränderung des Embryos mit Erhöhung der Zellzahl im Primitivstreifen zu erreichen.

In einer neueren Arbeit am Embryo der Maus wurden minimale, den hier beobachteten *L-* und *U-Turns* ähnliche Zellbewegungen dokumentiert, ohne dass komplexe Bewegungsmuster wie die *Convergent Extension* oder das *Processional Cell Movement* feststellbar waren. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine ortsständige Mesenchym- und Primitivstreifenbildung postuliert (Williams et al. 2012). Der Eizylinder wurde dabei in einem dem unseren ähnlichen Versuchsaufbau untersucht und dafür transgene Mäuse mit zellmembranständigem grün-fluoreszierendem Protein genutzt. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Morphologie des Embryos (Keimscheibe versus Eizylinder) ist es nicht verwunderlich, dass sich abweichende Befunde für die Zellbewegungen am Beginn der Gastrulation ergeben. Die Ergebnisse am Ka-

ninchenembryo weisen vielmehr auf eine Rolle des *Processional Cell Movement* in der Vorbereitung der Gastrulation beim Menschen hin.

3.5 Mitosen und Primitivstreifenbildung

Die hier präsentierten Daten geben einen neuen Einblick in die Mechanismen der Primitivstreifenbildung und Formung der Keimscheibe im Rahmen der Gastrulation eines typischen Säugetierembryos. Der Nachweis einer nicht zufälligen Ausrichtung mit rascher Orientierungsänderung betont die Rolle der gerichteten Zellteilung im Rahmen der frühen embryonalen Entwicklung. Diese Daten ergänzen jene vom Krallenfrosch *Xenopus laevis*, für den eine Beteiligung der OCD am Neuralrohrschluss gezeigt werden konnte (Kieserman und Wallingford 2009). Mit der von Williams et al. (2012) genutzten Methode der Zellbeobachtung sollten zukünftig auch Untersuchungen zur möglichen OCD im Rahmen der Gastrulation der Maus durchgeführt werden; der Vergleich mit dem Kaninchenembryo scheint besonders aufgrund der bereits gefundenen Unterschiede bei den Bewegungsmustern interessant. Insgesamt decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit jenen am Zebrafisch (Concha und Adams 1998), erlauben jedoch noch nicht den sicheren Analogschluss auf die Bedeutung der Mitosenausrichtung für die Gastrulation. Hierzu fehlt die beim Zebrafisch bereits erfolgte Absicherung durch die Manipulation des PCP-Signalweges, welcher auch im Kaninchenembryo einen Einfluss auf die Mitosenausrichtung haben könnte (Gong et al. 2004). Hier sind der experimentellen Kontrolle durch die bereits beschriebene geringe Verfügbarkeit von genetischen Manipulationsmöglichkeiten Grenzen gesetzt. Die von Gong et al. (2004) beim Zebrafisch angewendete mRNA-Injektion zur Blockade des PCP-Signalweges müsste für das Kaninchen erst etabliert werden. Beim Vergleich der Daten mit der zweiten Originalarbeit ist zu beachten, dass bei Gong et al. (2004) für die Definition der Teilungsachse die Verbindungslinie zweier Tochterkerne verwendet wurden, in der vorliegenden Arbeit jedoch die Ausrichtung der Metaphasenplatte. Die Werte unterscheiden sich daher systematisch um 90° voneinander.

3.6 Experimentelles Potential der Zellablation

In der ersten Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Modifikation der 2-p-LRM mit hoher Genauigkeit Einzelzellen ohne Schädigung der benachbarten

Zellen zerstört werden können. Die Herausforderung in der Ablation größerer Zellareale besteht im Aufbau der Blastozyste mit ihrem flüssigkeitsgefüllten Inneren, denn eine Perforation zwischen Zona pellucida und Blastozystenöhle hätte den Kollaps der Blastozyste zur Folge. Mit der Anzahl der zu zerstörenden Zellen sollte auch das Risiko einer solchen Perforation steigen.

Für mehrere Modellorganismen gibt es bereits experimentelle Ansätze für die Laserablation. Am Fruchtfliegenembryo wurde mit LRM die Reparatur von Epitheldefekten (Fernandez-Gonzales und Zallen 2013) anhand von markiertem Actin und Myosin II untersucht. Ein solches Markierungsverfahren müsste für das Kaninchen erst verfügbar gemacht werden. Am Säugetiermodell Maus konnte die Laserablation von Zellgruppen durchgeführt und die Kompensationsfähigkeit im Rahmen der weiteren Entwicklung dokumentiert werden (Angelo und Tremblay 2013).

Die hier erprobte Laserablation hat in Anbetracht der zukünftig möglichen längeren Kultivierungszeit ein hohes Potential. Erforderlich ist jedoch auch die Etablierung von Identifikations- und Markierungsverfahren für die zu zerstörenden Zellen. Ein solches Verfahren vorausgesetzt, ist zum Beispiel die Abtragung von solchen Arealen des Hypoblasten denkbar, für die eine Beeinflussung der Epiblastschicht durch Signalmoleküle bekannt ist (Idkowiak 2004).

3.7 Beitrag zum Verständnis der Gastrulation

Die deutlichen Unterschiede im Ablauf zwischen den verschiedenen Wirbeltieren (für Zebrafärbling, Maus und Kaninchen vgl. Gong et al. 2004, Williams et al. 2012 und die 2. Originalarbeit) sind nicht überraschend. Sie machen vielmehr deutlich, dass sich im Laufe der Evolution verschiedene Abläufe herausgebildet haben, um in morphologisch unterschiedlichen Organismen das Ziel der Keimblattbildung zu erreichen. Die hier kumulierten Arbeiten konnten erstmals zeigen, dass im Kaninchenembryo mit säugertypischer Morphologie sowohl gerichtete Zellteilungen als auch lokale Zellbewegungen im Rahmen der Gastrulation auftreten. Zuvor postulierte Migrationsmuster (Viebahn et al. 2002) bestätigten sich in ihrer Richtung und konnten als kurzstreckige Bewegung von Zellgruppen identifiziert werden.

Für das Verständnis der menschlichen Frühentwicklung liefern die entwickelten Methoden und gewonnenen Informationen wichtige Ansätze für weitere Untersuchungen. Bei der Identifizierung der konkreten Anteile von Zellbewe-

gung und Zellteilung an der Gastrulation wird es auf die Integration molekularbiologischer Methoden ankommen (vgl. Gong et al. 2004, Carvalho et al. 2009). Ein mögliches Anwendungsfeld ist die Aufdeckung der Mechanismen hinter den Frühaborten mit Nachweis von embryonalen chromosomalen Aberrationen beim Menschen (Sadler 2003), einem Phänomen, dem aufgrund der frühen Beendigung von Schwangerschaften mit nicht lebensfähiger Leibesfrucht eine hohe evolutionäre Bedeutung zukommen könnte. Die hier gezeigte Komplexität der proliferativen und migratorischen Aktivität von Zellen unmittelbar vor der Gastrulation lässt eine besondere Anfälligkeit für Störungen in dieser zentralen Entwicklungsphase annehmen, so dass Abweichungen bei der Koordination von Zellbewegung und Zellteilung auch eine mögliche Erklärung für die häufigen Aborte beim Menschen gegen Ende der zweiten Entwicklungswoche sein können.

4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens für die Beobachtung von Zellbewegung und Zellteilung in einem säugertypischen Embryo während der Primitivstreifenbildung. Das Kaninchen schien als Modellorganismus aufgrund seiner den meisten Säugern einschließlich des Menschen ähnlichen Morphologie in der Phase der Gastrulation und seiner experimentellen Zugänglichkeit hierfür am besten geeignet. Durch Zusammenführung, Erprobung und Modifizierung von bekannten Kultivierungstechniken, Färbemethoden und Mikroskopieverfahren konnte die physiologische Entwicklung des Embryos erhalten und gleichzeitig die Bildgebung auf zellulärer Ebene durchgeführt werden. Durch komplementäre Anwendung von Laserrastermikroskopie und DIC-Mikroskopie wurde die Eignung der entwickelten Verfahren getestet und die Validität der Ergebnisse gesichert.

Im ersten Schritt wurde die Färbung des Kaninchenembryos mit gängigen DNS-Farbstoffen erfolgreich durchgeführt und durch Beurteilung morphologischer Kriterien die unbeeinträchtigte kurzfristige Entwicklung dokumentiert. Anschließend konnte durch den Vergleich der Gewebeschädigung in hochauflösenden Dünnschnitten die Multiphotonenmikroskopie als geeignete Beobachtungstechnik identifiziert und erste Aufnahmen des Embryos angefertigt werden.

Im zweiten Schritt gelang die Dokumentation von einfachen (*L-* und *U-Turns*) und komplexen (*Processional Cell Movement*) Zellbewegungen sowie gerichteten Zellteilungen. Durch parallele Verwendung des DIC konnte auch hier sichergestellt werden, dass diese Phänomene keine durch Färbung oder Lasereinwirkung hervorgehobenen Artefakte darstellen. Eine ursächliche Beteiligung dieser Bewegungsmuster an der Primitivstreifenbildung und damit der Initiierung der Gastrulation liegt daher nahe. Als Nebenbefund ergab sich mit der 2-p-Laserrastermikroskopie auch die Möglichkeit zur Abtragung einzelner Zellen mit Zerstörung des Zellkerns durch Laserbeschuss; dieses gelang ohne Schädigung der Nachbarzellen oder Zerstörung des Zellverbandes.

Insgesamt wurde ein System für die Darstellung und Manipulation von Zellteilung und Zellbewegung im Rahmen der Gastrulation im Säugetierembryo entwickelt. Aufgrund der gegebenen morphologischen Ähnlichkeiten im untersuchten Zeitraum stellen bereits die ersten Beobachtungen am Kaninchen einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Gastrulation der Säugetiere einschließlich des Menschen dar.

5 Literaturverzeichnis

Angelo JR, Tremblay KD (2013): Laser-mediated cell ablation during post-implantation mouse development. *Dev Dyn* 242(10) 1202-1209

Beddington RS (1982): An autoradiographic analysis of tissue potency in different regions of the embryonic ectoderm during gastrulation in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 69 265-285

Bodenstein L, Stern CD (2005): Formation of the chick primitive streak as studied in computer simulations. *J Theor Biol* 233(2) 253-269

Cai XY, Xiong LM, Yang SH, Shao ZW, Xie M, Gao F, Ding F (2014): Comparison of toxicity effects of ropivacaine, bupivacaine and lidocaine on rabbit intervertebral disc cells in vitro. *Spine J* 14(3)483-490

Carvalho L, Stühmer J, Bois JS, Kalaidzidis Y, Lecaudey V, Heisenberg CP (2009): Control of convergent yolk syncytial layer nuclear movement in zebrafish. *Development* 136(8) 1305-1315

Chang TN, Keshishian H (1996): Laser ablation of *Drosophila* embryonic motoneurons causes ectopic innervation of target muscle fibers. *J Neurosci* 16(18) 5715-5726

Concha ML, Adams RJ (1998): Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: a time-lapse analysis. *Development* 125(6) 983-994

Daniel JC Jr, Olson JD (1966): Cell movement, proliferation and death in the formation of the embryonic axis of the rabbit. *Anat Rec* 156(2) 123-127

Dedov VN, Cox GC, Roufogalis BD (2001): Visualisation of mitochondria in living neurons with single- and two-photon fluorescence laser microscopy. *Micron* 32(7) 653-660

- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248(4951) 73-76
- Fernandez-Gonzalez R, Zallen JA (2013): Wounded cells drive rapid epidermal repair in the early *Drosophila* embryo. *Mol Biol Cell* 24(20) 3227-3237
- Ge J, Wood DK, Weingeist DM, Prasongtanakij S, Navasumrit P, Ruchirawat M, Engelward BP (2013): Standard fluorescent imaging of live cells is highly genotoxic. *Cytometry A* 83(6) 552-560
- Gong Y, Mo C, Fraser SE (2004): Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430 689-693
- Haraguchi T, Ding DQ, Yamamoto A, Kaneda T, Koujin T, Hiraoka Y (1999): Multiple-color fluorescence imaging of chromosomes and microtubules in living cells. *Cell Struct Funct* 24(5) 291-298
- Hartwig A, Dally H, Schlepegrell R (1996): Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett* 1996 88(1-3) 85-90
- Heisterkamp A, Maxwell IZ, Mazur E, Underwood JM, Nickerson JA, Kumar S, Ingber DE (2005): Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Opt Express* 13(10) 3690-3696
- Hertzler PL, Clark WH Jr. (1992): Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: invagination is accompanied by oriented cell division. *Development* 116(1) 127-140
- Idkowiak J, Weisheit G, Plitzner J, Viebahn C (2004): Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. *Dev Genes Evol* 214(12) 591-605
- Jessen JR (2012): Analyzing planar cell polarity during zebrafish gastrulation. *Methods Mol Biol* 839 69-78

Keller RE, Danilchik M, Gimlich R, Shih J (1985): The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 89 185-209

Kieserman EK, Wallingford JB (2009): In vivo imaging reveals a role for Cdc42 in spindle positioning and planar orientation of cell divisions during vertebrate neural tube closure. *J Cell Sci* 22(Pt 14) 2481-2490

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3) 253-310

Komiya Y, Habas R (2008): Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4(2) 68-75

Lalande ME, Ling V, Miller RG (1981): Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(1) 363-367

Lawson A, Schoenwolf GC (2003): Epiblast and primitive-streak origins of the endoderm in the gastrulating chick embryo. *Development* 130(15) 3491-3501

Lawson KA, Pedersen RA (1987): Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. *Development* 101(3) 627-652

Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA (1991): Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113(3) 891-911

Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ (1977): Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat* 148(1) 85-119

Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S (2007): Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 148(4) 1797-1803

Montell DJ, Keshishian H, Spradling AC (1991): Laser ablation studies of the role of the *Drosophila* oocyte nucleus in pattern formation. *Science* 254(5029) 290-293

Nomarski G (1957): From phase contrast to contrast by interference. *Rev Hematol* 12(4) 439-442

Perea-Gomez A, Lawson KA, Rhinn M, Zakin L, Brûlet P, Mazan S, Ang SL (2001): *Otx2* is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo. *Development* 128(5) 753-765

Sadler TW: *Medizinische Embryologie*. 10. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003

Shook DR, Majer C, Keller R (2002): Urodeles remove mesoderm from the superficial layer by subduction through a bilateral primitive streak. *Dev Biol* 248(2) 220-239

Stern CD: *Gastrulation: From cells to embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2004

Sulik K, Dehart DB, Iangaki T, Carson JL, Vrablic T, Gesteland K, Schoenwolf GC (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn* 201(3) 260-278

Szalek E, Karbownik A, Grabowski T, Sobanska K, Wolc A, Grzeskowiak E (2013): Pharmacokinetics of sunitinib in combination with Fluoroquinolones in rabbit model. *Pharmacol Rep* 65(5) 1383-1390

Tada M, Heisenberg CP (2012): Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos. *Development* 139(21) 3897-3904

Tam PP, Beddington RS (1987): The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* 99(1) 109-126

Viebahn C, Stortz C, Mitchell SA, Blum M (2002): Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 129(10) 2355-2365

Viebahn C: Gastrulation in the rabbit; in: *Gastrulation*, hrsg. v. Stern CDS. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2004, 263-274

Waddington CH, Waterman AJ (1933): The Development in vitro of Young Rabbit Embryos. *J Anat* 67(Pt 3) 355-370

Wang Z, Li Y, Kong D, FH (2010): The Role of Notch Signaling Pathway in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) During Development and Tumor Aggressiveness. *Curr Drug Targets* 11(6) 745-751

Wei Y, Mikawa T (2000): Formation of the avian primitive streak from spatially restricted blastoderm: evidence for polarized cell division in the elongating streak. *Development* 127(1) 87-96

Williams M, Burdsal C, Periasamy A, Lewandoski M, Sutherland A (2012): Mouse primitive streak forms in situ by initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev Dyn* 241(2) 270-283

Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, Strekowski L (1990): DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29(36) 8452-8461

Wu YC, Wang X, Xue (2012): Methods for studying programmed cell death in *C. elegans*. *Methods Cell Bio* 107 295-320

Yen WW, Williams M, Periasamy A, Conaway M, Burdsal C, Keller R, Lu X, Sutherland A (2009): PTK7 is essential for polarized cell motility and convergent extension during mouse gastrulation. *Development* 136(12) 2039-2048

Danksagungen

Ich danke Prof. Viebahn für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit durch alle Höhen, Tiefen und Umwege. Durch seine Motivation zur rechten Zeit war letztlich die Fertigstellung dieser Dissertationsschrift möglich.

Den Koautoren der veröffentlichten Arbeiten (allen voran Dr. Püschel) danke ich für die Zusammenarbeit und die Einbringung der jeweiligen Expertise in die gemeinsamen Projekte.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern danke ich für die Aufnahme in das Institut und die Weitergabe von wissenschaftlichen und technischen Wissen über Arbeitsgruppengrenzen hinaus.