

Aus dem Institut für Anatomie und Embryologie
(Prof. Dr. med. C. Viebahn)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Entwicklung und Evaluation einer photoablativen Technik zur räumlich
hochauflösenden, selektiven Entfernung von Epithelien in
Hühnerembryonen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Janine Döring

aus

Heiligenstadt

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent: PD Dr. med. J. Männer
Ko-Referent: PD Dr. Roland Dosch
Drittreferent: Prof. Dr. Rainer Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 01.April 2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Entwicklung und Evaluation einer photoablativen Technik zur räumlich hochauflösenden, selektiven Entfernung von Epithelien in Hühnerembryonen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Mikrochirurgische Verfahren in der experimentellen Embryologie	1
1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Embryonen	9
2.2 Photosensibilisator Bengalrosa	9
2.3 Applikation des Photosensibilisators	10
2.3.1 Membranstempel	10
2.3.2 Experimenteller Eingriff.....	11
2.4 Befunderhebung und Dokumentation	14
2.4.1 Dokumentation des Färbeergebnisses	14
2.4.2 Nachweis des phototoxischen Effektes mittels Trypanblauausschlusstest.....	15
2.4.3 Mikroskopische Analysen am <i>whole-mount</i> - Präparat	18
2.4.4 Histologische Analysen.....	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Stereomikroskopische Beurteilung von Färbeerfolg und phototoxischem Effekt ...	19
3.2 Histologische Beurteilung der Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes.....	20
4 Diskussion	26
4.1 Beurteilung der Einsetzbarkeit der von mir entwickelten Technik.....	26
4.2 Mögliche Ursachen für die Variation meiner Ergebnisse	28
4.3 Ausblick: Strategien zur Verbesserung der Technik.....	32
5 Zusammenfassung	34
6 Literaturverzeichnis	37

1 Einleitung

1.1 Mikrochirurgische Verfahren in der experimentellen Embryologie

In der Embryonalentwicklung spielen lokale Ansammlungen von spezialisierten Zellen und Geweben wichtige Rollen bei der Bildung und Entwicklung von Körperanhängseln und Organen (Gilbert 2000). Diese morphogenetischen Rollen können von zweierlei Natur sein. Erstens können derartige Zellverbände als Quellen für zelluläre und nichtzelluläre Baumaterialien von Körperorganen fungieren. Als ein Beispiel sei hier die endodermale Leberknospe genannt, die die epithelialen Zellpopulationen (Hepatozyten und Gallenwegsepithelien) der späteren Leber liefert (Lemaigre und Zaret 2004). Zweitens können bestimmte embryonale Zellverbände die Entwicklung von Körperorganen durch die Abgabe von Signalstoffen an angrenzende Zellverbände steuern, auch wenn sie keinen direkten materiellen Beitrag zum Aufbau dieser Organe leisten. Diese letztgenannte Form der Interaktion von embryonalen Zellverbänden wird auch als Induktion bezeichnet (Gilbert 2000). Als ein Beispiel sei hier die Induktion der Entwicklung von Herzmuskelgewebe im so genannten *Seitenplattenmesoderm* genannt. Dieser Induktionsprozess wird von Signalstoffen gesteuert, die vom *Endoderm* des späteren *Pharynx* an die *Mesodermzellen* im anliegenden *Seitenplattenmesoderm* abgegeben werden. (Brade et al. 2013).

Um die entwicklungsbiologische Rolle von embryonalen Zellverbänden aufzuklären, bedient sich die experimentelle Embryologie klassischerweise mikrochirurgischer Verfahren, die meist an Embryonen von Eier legenden Modellorganismen (z. B. Amphibien, wie *Xenopus laevis*, oder Hühnerembryonen) durchgeführt werden (Männer 1992). Im Ei sind Embryonen nicht nur leicht zugänglich, es ist darüber hinaus auch möglich, die Entwicklung der Embryonen nach einem experimentellen Eingriff ohne größeren technischen Aufwand weiterlaufen zu lassen und somit die Langzeiteffekte des Eingriffs zu

analysieren. Prinzipiell kann man drei Arten mikrochirurgischer Experimente zur Klärung von entwicklungsbiologischen Rollen embryonaler Zellverbände unterscheiden: (1.) Zur Klärung von materiellen Beiträgen werden idealerweise so genannte *Fate-Mappings* des fraglichen Zellverbandes durchgeführt (Schoenwolf 2001). Hierbei wird der fragliche Zellverband entfernt und durch einen gleichwertigen ersetzt, dessen Zellen mit einem leicht nachzuweisenden Marker (z. B. ein Vitalfarbstoff) ausgestattet sind. Dieser Marker darf die Zellen nicht verlassen können und in den übrigen Zellen des Empfängerembryos nicht vorhanden sein. Analysen des räumlichen Verteilungsmusters und der Differenzierung markierter Zellen nach festgelegten postinterventionellen Entwicklungsintervallen können Auskunft über das Schicksal (*Fate*), und damit den materiellen Beitrag des Zellverbandes zu bestimmten Körperstrukturen, geben. Ein Beispiel für derartige Eingriffe sind so genannte Wachtelhuhn - Chimärisationsexperimente (Le Douarin 1973; Le Lièvre und Le Douarin 1975). Wachteln und Haushühner gehören zu den Hühnervögeln. Die embryonalen Zellen beider Spezies zeigen ein gleichwertiges Verhalten. Die Zellen von Wachteln besitzen jedoch einige Antigene, die sich bei Haushühnern nicht finden und sich mit spezifischen Antikörpern nachweisen lassen. Im Anschluss an die Transplantation eines zu untersuchenden Zellverbandes aus einem Wachtelembrryo in einen gleich alten Haushuhnembryo lässt sich somit das Schicksal dieses Zellverbandes, anhand der Expression der wachtelspezifischen Antigene, verfolgen. (2.) Zur Klärung von materiellen und/oder regulatorischen bzw. induktiven Beiträgen kann der fragliche Zellverband in Embryonen eines Modellorganismus entfernt (Weaver und Hogan 2001; Schoenwolf 2001) oder, falls dies nicht möglich ist, von seinen möglichen Zielgeweben durch Implantation einer Barriere physikalisch isoliert werden (Hamburger 1946; Männer 1993; Weaver und Hogan 2001). Derartige Funktionsverlustexperimente erzeugen im Idealfall Entwicklungsdefekte, die Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung

des entfernten Zellverbandes erlauben. (3.) Zur Klärung induktiver Rollen kann der fragliche Zellverband darüber hinaus aus seinem normalen geweblichen Kontext entfernt und an eine andere Stelle transplantiert werden (heterotope Transplantation). Aus dem Verhalten der neuen Umgebung, z. B. heterotope Differenzierung von Herzmuskelgewebe, können Rückschlüsse zu induktiven Funktionen des transplantierten Zellverbandes gezogen werden.

Wie bereits erwähnt, werden die o. g. Arten von Experimenten mittels mikrochirurgischer Verfahren durchgeführt. Das hierbei genutzte Instrumentarium muss häufig individuell durch den/die Experimentator(in) hergestellt werden, um den besonderen Anforderungen der zu operierenden Embryonen gerecht zu werden (Schoenwolf 2001). Für das Durchtrennen von Geweben (Schneiden) werden üblicherweise feinste Nadeln aus Wolframdraht oder Glas, bei größeren Objekten auch kommerziell erhältliche mikrochirurgische Scheren, benutzt (Pérez-Pomares et al. 2002, Steding und Seidl 1980). Zum Fassen von Gewebe werden feinste Pinzetten (*Dumont*-Pinzetten) und für den Transfer von herausgeschnittenen Zellverbänden meist Pipetten (z. B. Spemann-Pipetten) verwendet. Besondere Schwierigkeiten in der experimentellen Mikrochirurgie von Embryonen liegen in der Tücke des Objektes: Wirbeltierembryonen sind sehr kleine Objekte, die dem/der Experimentator(in) ein hohes Maß an manuellem Geschick abverlangen. Ein Hühnerembryo hat zu Beginn der Herztätigkeit eine Körperlänge von gerade einmal 5 mm (eigene Messung). Weiterhin erschwert die hohe Transparenz embryonaler Gewebe das visuelle Erkennen von anatomischen Grenzen während des Eingriffes. Eine hierdurch bedingte unzureichende visuelle Kontrolle der Schnittführung kann die Spezifität des Eingriffes erheblich einschränken, indem entweder zu wenig oder zu viel Gewebe (erwünschtes Gewebe + unerwünschtes angrenzendes Gewebe) entfernt wird (DeHaan 1964). Die unzureichende Sichtbarkeit natürlicher und künstlich erzeugter anatomischer Grenzen erschwert auch eine photographische Dokumentation des Ausmaßes

des experimentellen Eingriffes. Neben den o. g. optischen Ursachen wird die chirurgische „Trennschärfe“ einer Extirpation von embryonalem Gewebe zusätzlich noch durch eine hohe „Klebrigkeit“ embryonaler Gewebe eingeschränkt. Die z. T. sehr hohen Anforderungen an die manuellen und visuellen Fähigkeiten des/der Experimentator(s/in) können die Reproduzierbarkeit von mikrochirurgischen Experimenten an Embryonen und somit die Aussagekraft von Ergebnissen derartiger Experimente erheblich einschränken.

Auch von einer anderen Seite lässt sich die Aussagekraft mikrochirurgischer Experimente, insbesondere von Funktionsverlustexperimenten, in Frage stellen. So ist zu bedenken, dass vor allem bei der Entfernung von Epithelarealen aus dem *Ecto-* oder *Endoderm* z. T. großflächige Wunden gesetzt werden. Derartige Defekte könnten das Ergebnis von Funktionsverlustexperimenten über zwei verschiedene Wege verfälschen: (1.) Durch den Wegfall der epithelialen Schutzschicht könnten die darunterliegenden Gewebeschichten nicht nur einer Quelle von induktiven Signalen beraubt werden, sondern möglicherweise auch mit schädigenden Agenzien aus der Amnionflüssigkeit (bei Entfernung von *Ektoderm*) oder dem Dottersackinhalt (bei Entfernung von *Endoderm*) in Kontakt kommen. Gerade von der Amnionflüssigkeit ist bekannt, dass sie Toxine enthält, die z. B. für die Entstehung von neurologischen Schäden bei *Spina bifida aperta* verantwortlich gemacht werden (Thiel 2012). (2.) Entsprechend den Verhältnissen im postnatalen Organismus könnte es durch das mit dem Eingriff verbundene Gewebetrauma auch im Wundbett des Embryos zur Freisetzung von Signalstoffen kommen, die die weitere Entwicklung der lokalen Strukturen in unspezifischer Weise stören könnten. Der hieraus resultierende experimentelle Phänotyp könnte dann fälschlicherweise als eine Folge des Fehlens induktiver Signale aus dem entfernten Gewebeareal interpretiert werden.

Angesichts der genannten Schwächen von traditionellen mikrochirurgischen

Verfahren zur Entfernung von embryonalen Geweben stellt sich die Frage, ob es nicht andere, handwerklich leicht durchzuführende Techniken gibt, mit denen sich morphogenetisch aktive Gewebe in Embryonen auf schonende und selektive Weise entfernen lassen und die darüber hinaus auch noch eine visuelle Dokumentation des Gewebedefektes erlauben. In verschiedenen Bereichen der Human- und Zahnmedizin werden sogenannte photodynamische Therapieverfahren zur selektiven, d. h. die Umgebung schonenden Entfernung von pathologischen Geweben erfolgreich eingesetzt (Dolmans et al. 2003; Moan und Peng 2003; Saini und Pah 2013). Bei diesen Therapien werden Kombinationen von zwei, individuell nicht toxischen Komponenten angewandt, um Gewebsdefekte in sauerstoffabhängiger Weise zu erzeugen. Bei solchen Komponenten handelt es sich (1.) um eine photoaktivierbare Substanz - den sogenannten Photosensibilisator - und (2.) um Licht einer bestimmten Wellenlänge, die den Photosensibilisator anregt. Bei Anwesenheit von Sauerstoff werden durch die Anregung des Photosensibilisators Sauerstoffradikale erzeugt, die Zellen zerstören können. Dieser Effekt wird als Phototoxischer Effekt bezeichnet. Aufgrund der hohen Reaktivität sowie der kurzen Halbwertszeit von Sauerstoffradikalen, sind phototoxische Effekte räumlich auf Zellen und Gewebe beschränkt, die mit dem Photosensibilisator beladen wurden. In der Vergangenheit sind photodynamische Verfahren bereits erfolgreich zur selektiven, d. h. minimal invasiven Entfernung von Geweben in Embryonen eingesetzt worden (Shankland 1984; Nishida und Satoh 1989; Ettensohn 1990). Auch in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Männer konnte eine phototoxische Substanz erfolgreich zur selektiven Entfernung einer embryonalen Zellpopulation, dem sog. *Proepikard*, eingesetzt werden (Männer 2005; Männer 2013). Bei dieser Substanz handelt es sich um Bengalrosa. Dieser magentafarbige Farbstoff eignet sich aus verschiedenen Gründen sehr gut für die photochemische Entfernung von Geweben im Embryo: (1.) Er ist wasserlöslich, sodass er ohne Hilfe

von organischen Lösungsmitteln appliziert werden kann. (2.) Die mit ihm beladenen Gewebeareale lassen sich aufgrund einer intensiven Rotfärbung visuell gut von ungefärbten, d. h. nicht behandelten Geweben abgrenzen. Hierdurch ist eine räumlich hochselektive Applikation des Photosensibilisators unter lupenoptischer Sichtkontrolle möglich. (3.) Bengalrosa wird durch Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich aktiviert, sodass keine speziellen kostenintensiven Beleuchtungseinrichtungen (z. B. UV-Lampen) benötigt werden. (4.) Der Farbstoff ist kostengünstig zu erwerben.

Beim *Proepikard* handelt es sich um ein blumenkohlartiges Gebilde, das sich von der *ventralen* Wand des *Sinus venosus* in die embryonale Perikardhöhle vorwölbt (Virágh und Challice 1981; Männer 1992; Virágh et al. 1993; Männer et al. 2001). Für die Entfernung dieser Zellpopulation wird Bengalrosa in einer 1%igen wässrigen Lösung über eine Mikrokanüle appliziert, die in die embryonale Perikardhöhle eingeführt wird (Männer et al. 2005; Männer 2013). Die Farbstofflösung wird in mehreren kleinen Portionen in die Perikardflüssigkeit in unmittelbarer Umgebung des *Proepikards* injiziert. Ein Großteil des injizierten Farbstoffes bindet sich sofort an die Oberflächen der Zellen, während der in Lösung verbliebene Farbstoffanteil eines injizierten Tropfens sofort abgesaugt werden muss, damit er sich nicht in der Perikardhöhle verteilt und zu unselektiven Färbungen der Umgebung führt. Eine räumliche Begrenzung der Färbung, und damit des phototoxischen Effektes, lässt sich somit bei Applikation der Farbstofflösung über Mikrokanülen nur über ein manuell recht anspruchsvolles Vorgehen (Farbstoffapplikation, Absaugen, erneute Farbstoffapplikation) erreichen. Anhand dieser Tatsachen dürfte es nicht schwerfallen sich vorzustellen, dass die Applikation von Bengalrosa über eine Mikrokanüle ungeeignet ist, um größere Flächen im *Ektoderm* oder *Endoderm* selektiv zu entfernen. Aufgrund der Fluidität der Farblösung tendiert der Farbstoff dazu, sich unkontrolliert über die Epitheloberfläche auszubreiten, wenn

er über eine Mikrokanüle in Form von Flüssigkeitstropfen auf das zu entfernende Areal aufgebracht wird. Da die photodynamische Ablation von Zellverbänden einige Vorteile gegenüber herkömmlichen mikrochirurgischen Ablationsverfahren zu haben scheint, ist es wünschenswert, über eine Technik zu verfügen, mit der es möglich ist, Bengalrosa kontrolliert und räumlich begrenzt auch auf größere flache Zellverbände (*Ektoderm*, *Endoderm*) von Hühnerembryonen zu applizieren. So ließen sich morphogenetische Funktionen von *Ektoderm*- und *Endodermarealen* nicht nur mittels traditioneller mikrochirurgischer Ablationsverfahren, sondern auch mittels photodynamischer Ablationsverfahren experimentell überprüfen.

1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

(1.) Wesentliches Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung einer möglichst leicht zu handhabenden Technik, die es ermöglicht, in Form und Größe klar definierte Areale des *Ektoderms* von Hühnerembryonen *in ovo* mit Bengalrosa anzufärben. Um den experimentellen Eingriff so einfach und so atraumatisch wie möglich zu gestalten, sollte die zu entwickelnde Färbetechnik ohne mechanische Zerstörung der Dottermembran durchgeführt werden können. Letztgenannte Struktur umhüllt den Dotter und liegt somit auch oberflächlich vom *Keimscheibenektoderm*. Sie verleiht dem Dotter und der Keimscheibe mechanische Stabilität, ist aber für diffusible Stoffe und Atemgase durchgängig (Großfeld 1938). Diese Struktur besteht aus extrazellulären Fasern, ist aufgrund ihrer hohen Transparenz nahezu unsichtbar und muss für die Entfernung vom *Ektoderm* mit traditionellen mikrochirurgischen Verfahren durchtrennt werden. Letzteres bereitet erfahrungsgemäß vor allem ungeübten Experimentatoren große Schwierigkeiten, weshalb der Verzicht auf ein Durchtrennen der Dottermembran als eine signifikante Vereinfachung von experimentellen Techniken zur Entfernung von *Ektodermarealen* angesehen werden kann.

(2.) Die Klärung der Fragen, ob sich (A) die von mir entwickelte Technik zur räumlich selektiven Elimination der angefärbten *Ektodermareale* eignet und (B) ob diese Technik bei wiederholter Anwendung unter gleichen Bedingungen auch gleichbleibende Ergebnisse liefert.

2 Material und Methoden

2.1 Embryonen

Die vorliegenden Untersuchungen erfolgten an Hühnerembryonen der Rasse *White Leghorn*. Die befruchteten Hühnereier wurden vom Versuchsgut der Georg-August-Universität Göttingen bezogen und in einem handelsüblichen Brutschrank (Firma Janeschitz GmbH) bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75% inkubiert, bis die Embryonen das für den Eingriff vorgesehene Entwicklungsstadium erreicht hatten.

Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte auf der Grundlage der Normentafeln von Hamburger und Hamilton (1951), nachfolgend HH-Stadien genannt. Es wurden ausschließlich normal entwickelte Embryonen verwendet, die sich in den HH-Stadien 12 oder 13 befanden (Ende des 2. Bebrütungstages).

2.2 Photosensibilisator Bengalrosa

Als Photosensibilisator verwendete ich das rötlich gefärbte Fluoreszin-Derivat Bengalrosa (4,5,6,7- tetrachloro-2,4,5,7- teraiodofluorescein Dinatriumsalz; Sigma-Aldrich R 3877). Für die Applikation wurde eine 1%ige Gebrauchslösung von Bengalrosa (Abb.1) (in physiologischer Kochsalzlösung) unmittelbar vor den Experimenten zubereitet und in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur gelagert.

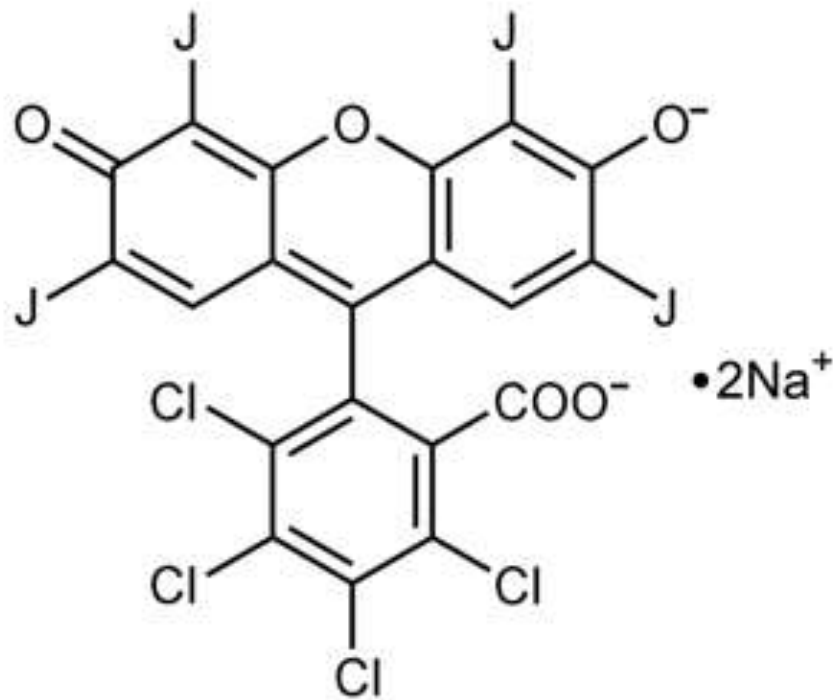


Abb.1: Strukturformel von Bengalrosa

Bengalrosa gehört zu der Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffen. Natrium- oder Kaliumsalz des Tetrajoddichlorfluoresceins ist ein tiefrosa färbender, bakteriologisch-mikroskopischer Farbstoff.

2.3 Applikation des Photosensibilisators

2.3.1 Membranstempel

Um die o. g. 1%ige Gebrauchslösung von Bengalrosa auf ein in Form und Größe klar definiertes Areal der über dem Embryo liegenden Dottermembran zu applizieren, wurden individuell zurechtgeschnittene quadratische Stückchen (1x1 mm) einer *Pure Nitrocellulose Unsupported Transfer Membran* der Firma Applichem als Stempel verwendet (Membrandicke 17 μm). Nitrozellulosemembranen werden in der biomedizinischen Forschung und Diagnostik häufig für Protein- und Nukleinsäurenachweise verwendet. Die o. g.

Nitrozellulosemembran besteht aus nicht verstärkter Nitrozellulose und wird als Membran der Wahl für alle Protein- oder Immunoblot-Anwendungen genutzt. Sie besitzt kein Zelluloseazetat, was eine höchst mögliche Bindung und Sensitivität beim Blotten von Proteinen sichern soll.

Die ca. 1x1 mm großen quadratischen Stückchen aus Nitrozellulosemembran wurden unter stereomikroskopischer Sichtkontrolle mittels einer augenchirurgischen Mikroschere aus einem ca. 2 x 3 cm großen Streifen herausgeschnitten und bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale bis zum Gebrauch gelagert.

2.3.2 Experimenteller Eingriff

Wie oben erwähnt, wurde der Photosensibilisator Bengalrosa mittels eines Stempelverfahrens appliziert. Für die Testung dieses Färbeverfahrens wählte ich den *kaudalen* Rumpfabschnitt von Embryonen der HH-Stadien 12 und 13 aus (nach ca. 2-tägiger Bebrütung). Embryonen dieser Entwicklungsstadien werden im Ei auch von ungeübten Experimentatoren(innen) gut erkannt und ihr *kaudaler* Rumpfabschnitt hat zu diesem Zeitpunkt noch eine flache, scheibenförmige Gestalt. Das *Ektoderm* des *kaudalen* Rumpfabschnittes liegt in diesen Stadien somit noch direkt unter der Dottermembran und bietet sich als Testareal für die Applikation des Farbstoffes an.

Der Eingriff erfolgte außerhalb des Brutschrankes bei Raumtemperatur. Nach der Entnahme aus dem Brutschrank wurde das Ei zunächst mit einer Schierlampe durchleuchtet, um die Lage des Embryos (Dotterkugel) und der Luftblase zu bestimmen. Hierbei wurde mit einem Bleistift ein rechteckiges Fenster aufgemalt, das die Position des Embryos markierte. Anschließend wurde die

Luftblase punktiert. Nach Fensterung der Eierschale über dem Embryo und Entfernung der darunterliegenden Schalenmembran sank der Dotter mit dem Embryo durch den Druckausgleich über die Punktionsstelle ab. Zum Schutz des Embryos vor unbeabsichtigten Verletzungen während weiterer Manipulationen im Bereich des Operationsfensters wurde der Dotter noch weiter abgesenkt. Dies geschah durch das Absaugen von ca. 1,5 ml Eiweiß über eine in die Punktionsstelle (Luftblase) eingeführte Injektionsnadel. Unter dem Stereomikroskop konnte der Embryo nun visuell begutachtet und auf spontane Fehlbildungen hin untersucht werden (Abb. 2). Des Weiteren wurde das Entwicklungsstadium bestimmt. Für die Untersuchungen sind ausschließlich normal entwickelte Embryonen in den HH-Stadien 12 oder 13 verwendet worden (siehe oben). Damit der Embryo während des Eingriffes nicht austrocknet, wurde die Oberfläche der über ihm liegenden Dottermembran mit einem Tropfen Locke'scher Lösung benetzt.

Ein als Stempel vorgesehenes Nitrozellulosemembranstückchen (1x1mm) wurde außerhalb des Eies für die Dauer von 1 Minute in die 1%ige Bengalrosa-Lösung eingelegt, damit es sich mit dem Photosensibilisator vollsaugt. Mittels einer *Dumont*-Pinzette wurde das frisch gefärbte Membranstückchen dann in das Ei transferiert, wo es auf die Dottermembran über dem *kaudalen* Rumpfabschnitt des Hühnerembryos gelegt wurde (Abb. 3A). Um zu testen, ob sich durch Variation der Auflagezeit das Ausmaß der Tiefenfärbung steuern lässt, wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt, bei denen der Membranstempel für eine unterschiedlich lange Zeit auf der Dottermembran belassen wurde: Versuchsreihe 1: 0,5 min; Versuchsreihe 2: 1 min; Versuchsreihe 3: 2 min; Versuchsreihe 4: 3 min; Versuchsreihe 5: 4 min. In jeder einzelnen Versuchsreihe sind 10 Embryonen verwendet worden. Während des gesamten Eingriffes wurde das Operationsfeld mit sichtbarem Licht, wie von Hara (1971) beschrieben,

beleuchtet. Durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht fand eine Photoaktivierung von Bengalrosa gleichzeitig mit der Applikation dieses Farbstoffes statt (Menon et al. 1989).

Nach Ablauf der spezifischen Auflagezeit der Versuchsreihen (0,5 - 4 min. siehe oben) wurde das Membranstückchen mittels einer *Dumont*-Pinzette wieder entfernt. Das zurückbleibende rot gefärbte Areal der Dottermembran hatte die Größe und Form des Stempels und konnte photographisch dokumentiert werden (Abb.3b). Danach wurde das Operationsfenster mit Leukosilk-Haftstreifen verschlossen und das Ei unter den oben genannten Bedingungen für weitere 2 Stunden im Brutschrank reinkubiert.



Abb. 2: Gefensteretes Ei mit Aufsicht auf einen Hühnerembryo im Stadium HH 12

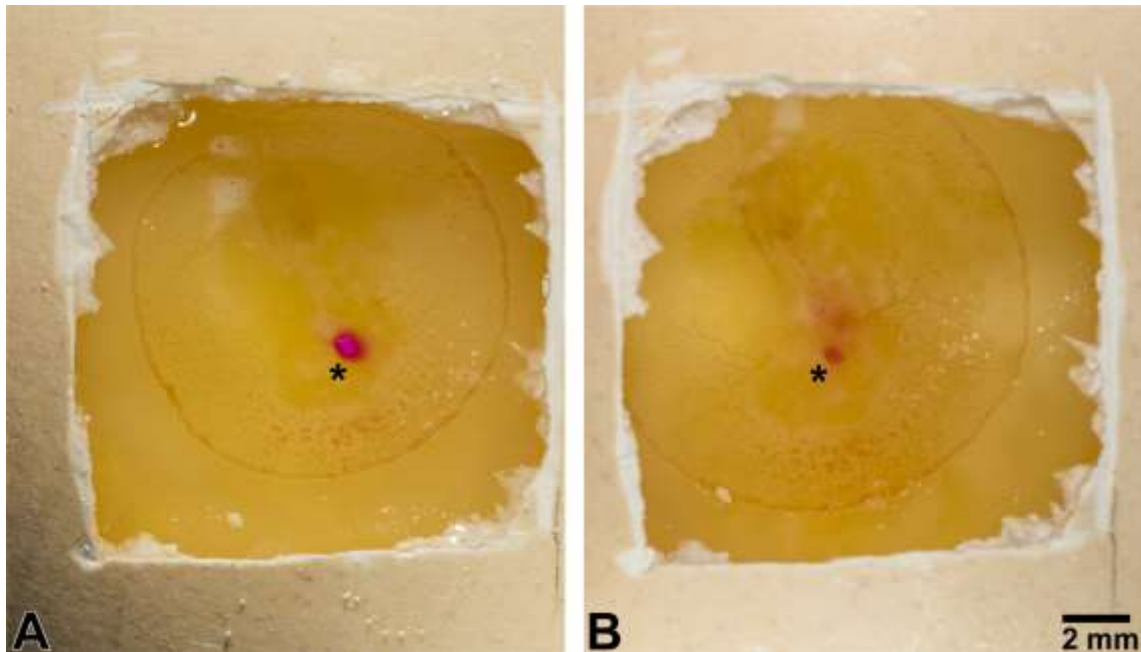


Abb. 3: Applikation des Photosensibilisators Bengalrosa. Ansicht eines Embryos mit aufgelegtem Nitrozellulosemembranstückchen * **(A)** und angefärbtem *Ektodermareal** nach Entfernung des Membranstückchens **(B)**.

2.4 Befunderhebung und Dokumentation

2.4.1 Dokumentation des Färbeergebnisses

Das Ausmaß der Anfärbung mit Bengalrosa wurde in direktem Anschluss an die Operation in ovo photographisch dokumentiert (siehe oben). Neben der Flächenausdehnung der Färbung wurde hierbei auch die Färbeintensität beurteilt. Letztgenannte wurde mittels einer semiquantitativen Skala bewertet (keine sichtbare Anfärbung = - ; leichte Anfärbung = + ; gute Anfärbung = ++; sehr gute Anfärbung = +++) und in einer Tabelle dokumentiert (Tab. 1)

2.4.2 Nachweis des phototoxischen Effektes mittels Trypanblauausschlusstest

Der Farbstoff Trypanblau (TB) ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der in der biomedizinischen Forschung in Form des so genannten „Trypanblauausschlusstestes“ häufig zur Testung der Vitalität von Zellen eingesetzt wird (Sellner 1989). Nach Gabe von TB in das Umgebungsmilieu von Zellen bleiben lebende Zellen ungefärbt, da sie in das Zytoplasma gelangte Farbstoffmoleküle aktiv ausschleusen. Tote Zellen hingegen können den Farbstoff nicht mehr aktiv ausschleusen und werden somit dunkelblau angefärbt. Da TB bei längerer Einwirkzeit selbst zytotoxische Effekte zeigt, muss die Auswertung unmittelbar nach Farbstoffzugabe durchgeführt werden. Für meine Versuche verwendete ich eine 1%ige TB-Lösung in Locke'scher Lösung.

Zur Durchführung des Trypanblauausschlusstestes wurde das Ei nach 2-stündiger Reinkubation (siehe oben) aus dem Brutschrank entnommen, erneut geöffnet und die Vitalität des Embryos im Ei überprüft. Anschließend wurde im Ei mittels einer handelsüblichen 5-ml-Injektionsspritze ein Tropfen der o. g. TB-Lösung auf das mit Bengalrosa gefärbte Areal getropft (Abb. 4A) und nach 1-minütiger Einwirkzeit der Restfarbstoff mit Locke'scher Lösung ausgewaschen (Auftropfen mittels handelsüblicher 5-ml-Injektionsspritze) (Abb. 4B). Für die Analyse wurde die Dottermembran mit Hilfe einer Mikroschere und *Dumont*-Pinzette geöffnet, der darunterliegende Embryo herausgeschnitten und mit Hilfe eines kleinen Sieblöffels aus dem Ei entnommen und in eine mit Locke'scher Lösung gefüllte Petrischale gelegt. Schon bei der ersten Betrachtung unter dem Stereomikroskop zeigte sich eine Blaufärbung des Testareals am *kaudalen* Ende des Embryos (Abb. 5). Für weitere visuelle Analysen des *whole-mount*-Präparates (Flächenausdehnung des phototoxischen Effektes) sowie für histologische Analysen (Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes) erfolgte nun die

Fixierung des Embryos in Bouin'scher Lösung (Männer et al. 1996).

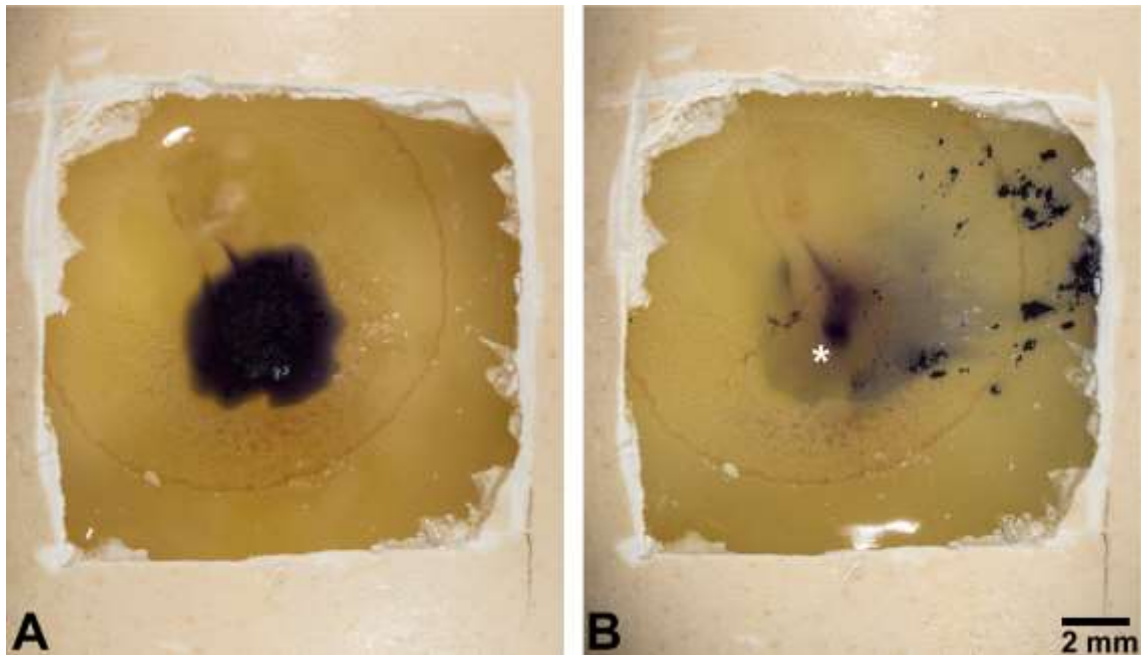


Abb. 4: Trypanblauausschlusstest in ovo. **A:** Nach zweistündiger Reinkubation erfolgt das Auftropfen einer 1%igen Trypanblaulösung auf den *kaudalen* Rumpfabschnitt des Embryos. **B:** Nach 2-minütiger Einwirkzeit und dem Abspülen der Trypanblaulösung wird eine intensive Blaufärbung des zuvor mit Bengalrosa angefärbten Areals * sichtbar.



Abb.5: Ergebnis des Trypanblauschlusstestes am *whole-mount*-Präparat **außerhalb des Eies**. Das mit Bengalrosa behandelte Areal zeigt eine deutliche Anfärbung mit Trypanblau * (Hühnerembryo im Stadium HH12-13). Abkürzungen: K = Kopf; H = Herz.

2.4.3 Mikroskopische Analysen am *whole-mount*- Präparat

Um die Konfiguration und Flächenausdehnung des phototoxischen Effektes zu analysieren und zu dokumentieren, wurden die fixierten Embryonen als *whole-mount*-Präparate unter einem Stereomikroskop (Olympus SZX12) im streifenden Auflicht analysiert und photographiert. Hierzu wurden die fixierten Embryonen in einer mit Locke'scher Lösung gefüllten Petrischale ausgebreitet. Neben der Flächenausdehnung der Färbung wurde, wie bei der Färbung mit Bengalrosa, auch die Färbeintensität beurteilt. Letztgenannte ist ebenfalls mittels einer semiquantitativen Skala bewertet (keine sichtbare Anfärbung = - ; leichte Anfärbung = +; gute Anfärbung = ++; sehr gute Anfärbung = +++) und in einer Tabelle dokumentiert worden (Tab. 1).

2.4.4 Histologische Analysen

Um die Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes zu analysieren und zu dokumentieren, wurden von mindestens drei Embryonen pro Versuchsreihe histo-logische Schnittserien angefertigt und im Durchlichtmikroskop begutachtet (0,5 Min. n = 3; 1,0 Min. n = 3; 2,0 Min. n = 5; 3,0 Min. n = 4; 4 Min. n = 4). Für die Herstellung von histologischen Präparaten sind die fixierten Embryonen über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und über Xylol als Zwischenmedium in Paraplast eingebettet worden. Von diesen Präparaten wurden Schnittserien in transversaler Schnittebene mit einer Schichtdicke von 7 μm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Nach absteigender Alkoholreihe erfolgte eine Färbung mit Kernechtrot im wässrigen Milieu. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Schnittserien und die photographische Dokumentation der Befunde erfolgten mit einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss (Axioplan 2). Kontrast und Helligkeit der digitalen Aufnahmen wurden am PC mittels Adobe Lightroom [®] nachkorrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 Stereomikroskopische Beurteilung von Färbeerfolg und phototoxischem Effekt

Zur Analyse des Färbeerfolges mit Bengalrosa (Flächenausdehnung/Intensität) und des Ausmaßes des phototoxischen Effektes (intravitale TB-Färbung) wurden alle Embryonen während der Lebendpräparation und nach entsprechender Fixierung mit Bouin'scher Lösung unter dem Stereomikroskop als *whole-mount*-Präparate untersucht und die Befunde mikrophotografisch dokumentiert (siehe oben). Hierbei zeigte sich, dass das von mir angewandte Färbeverfahren es prinzipiell ermöglicht, eine nach Form und Größe klar definierte Fläche des *Ektoderms* mit Bengalrosa anzufärben (Abb. 3 A, B). Allerdings zeigten sich innerhalb der Zeitgruppen deutliche Variationen in der Färbeintensität (Tab. 1).

Die nach zweistündiger Reinkubation durchgeführte Überprüfung des phototoxischen Effektes mittels TB-Ausschlusstest zeigte weiterhin, dass es (1.) zu einem phototoxischen Effekt gekommen war und dass sich dieser Effekt, wie gewünscht, auf das mit Bengalrosa angefärbte Areal beschränkte (Abb. 4 A, B). Wie bereits bei der Bengalrosa-Färbung waren auch hier deutliche Variationen in der Färbeintensität innerhalb einer Versuchsreihe erkennbar (Tab.1). Bei der Einzelfallanalyse fiel auf, dass die zuvor dokumentierten Werte der Färbeintensität mit Bengalrosa nicht mit der Intensität der TB-Färbung korrelierten. So konnte es z. B. im Falle einer als sehr gut bewerteten Bengalrosa-Färbeintensität nur zu einer als schwach bewerteten TB-Färbung kommen.

3.2 Histologische Beurteilung der Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes

Um die Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes zu analysieren und zu dokumentieren, wurden histologische Schnitte angefertigt und im Durchlichtmikroskop begutachtet. Insgesamt zeigte sich die Tendenz, dass mit Verlängerung der Einwirkzeit des Photosensibilisators (Bengalrosa) die Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes zunahm. Wie Tabelle 2 dokumentiert, war der phototoxische Effekt bei Färbezeiten (= Auflagezeit der Bengalrosagetränkten Membran) von bis zu 2 Minuten nur auf das *Ektoderm* beschränkt (Abb. 6 A, B, C). Ab 3-minütiger Färbedauer konnte neben dem *Ektoderm* auch das *Mesoderm* betroffen sein (Abb.6 D). Auch hier zeigte sich innerhalb der Versuchsreihen kein einheitliches Bild. So fanden sich z. B. Präparate, bei denen es selbst nach 2-minütiger Färbezeit von Bengalrosa nur zu einem partiellen Absterben von *Ektodermzellen* gekommen war. Auch kam es nicht in jedem Fall zu einer Beteiligung des *Mesoderms*, wenn die Färbezeit drei- oder vier Minuten betrug. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die von mir entwickelte Technik zur Photoablation von *Ektodermarealen* bei wiederholter Anwendung unter gleichen Bedingungen leider keine gleichbleibenden, d.h. vorhersagbaren, Ergebnisse liefert.

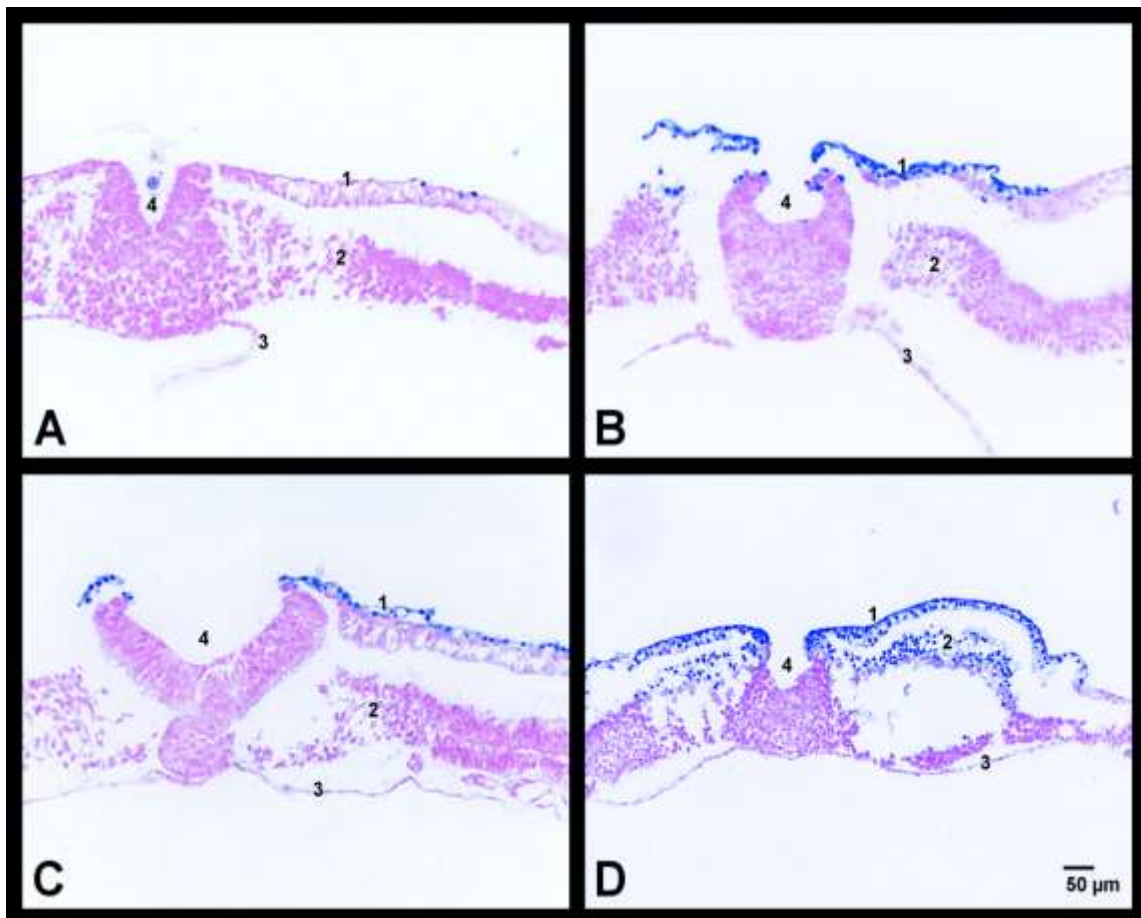


Abb.6: Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes (TB-Färbung) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des Photosensibilisators Bengalrosa.

Transversalschnitte von Hühnerembryonen im Stadium (HH12-13).

A: Anfärbung einzelner *Ektodermzellen* mit TB. Einwirkzeit 0,5 min.

B: Partielle Anfärbung des *Ektoderms* mit TB. Einwirkzeit 1 min.

C: Partielle Anfärbung des *Ektoderms* mit TB. Einwirkzeit 2 min.

D: Komplette Anfärbung des *Ektoderms*, partielle Anfärbung des *Mesoderms*. Einwirkzeit 3 min.

Abkürzungen: 1 = *Ektoderm*, 2 = *Mesoderm*, 3 = *Endoderm*, 4 = Neuralrinne

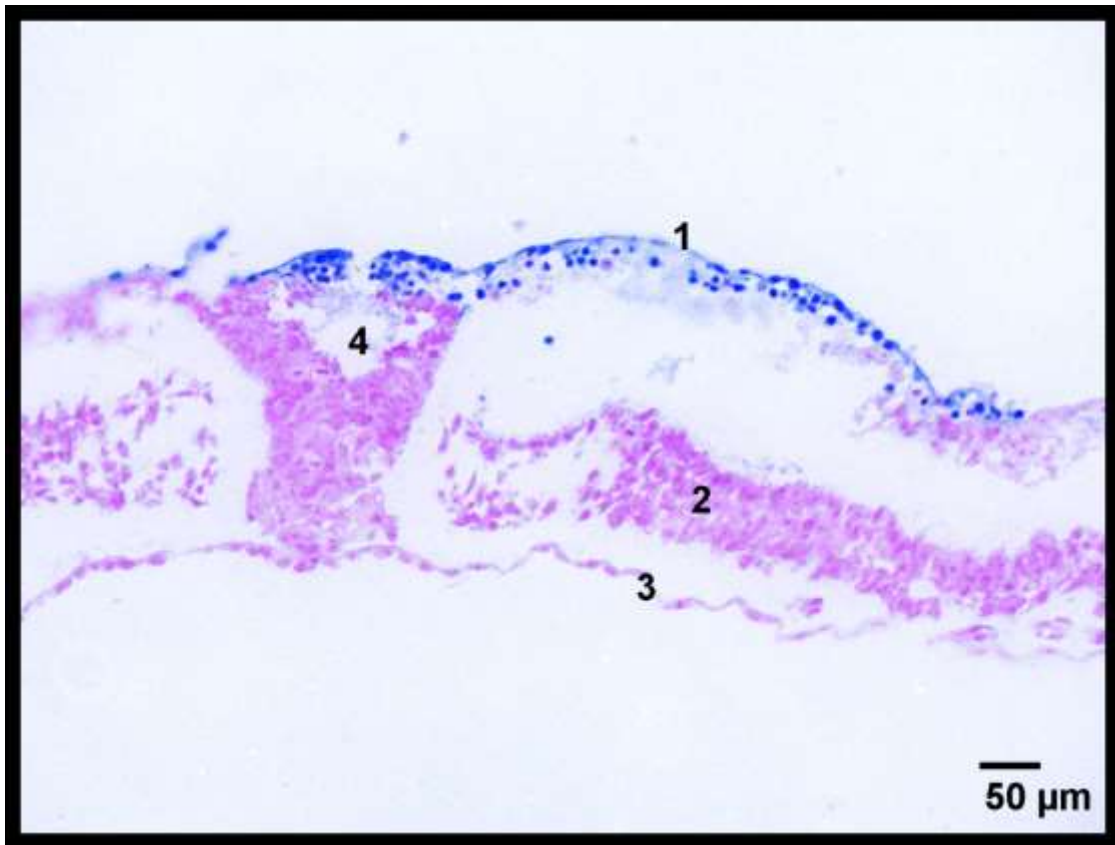


Abb.7: Variabilität des phototoxischen Effektes. Trotz 4-minütiger Einwirkzeit von Bengalrosa bleibt der phototoxische Effekt auf das *Ektoderm* beschränkt. Vergleiche mit Abb. 6.

Abkürzungen: 1= *Ektoderm*, 2=*Mesoderm*, 3= *Endoderm*, 4 =
Neuralrinne/Neuralrohr

Tabelle 1: Beziehung zwischen der BR-Färbedauer und Färbeintensitäten

BR-Färbedauer	Färbeintensität BR (im <i>whole-mount</i>)	Färbeintensität TB (im <i>whole-mount</i>)
0,5 Minuten (n = 10)	- 2 x + 3 x ++ 3 x +++ 2 x	Keine sichtbare Färbung 2x Leichte Färbung + 8x
1 Minute (n = 10)	- 2 x + 4 x ++ 3 x +++ 1 x	Keine sichtbare Färbung 7x Leichte Färbung + 3x
2 Minuten (n = 10)	- 1 x + 2 x ++ 3 x +++ 4 x	Leichte Färbung 1x Gute Färbung ++ 9x
3 Minuten (n = 10)	- 2 x + 2 x ++ 3 x +++ 3 x	Leichte Färbung + 2x Gute Färbung ++ 8x

4 Minuten (n = 10)	-	1 x	Leichte Färbung +	1x
	+	1 x		
	++	2 x	Sehr gute Färbung +++	9x
	+++	6 x		

Tabelle 2: Beziehung zwischen BR-Färbedauer und Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes (TB-Färbung)

BR-Färbedauer	Tiefenausdehnung TB-Färbung
0,5 Minuten (n = 3)	Keine Färbung: -
	Nur <i>Ektoderm</i> (partiell): 1 x
	Nur <i>Ektoderm</i> (komplett): 2 x
	<i>Ektoderm</i> und <i>Mesoderm</i> : -
1 Minute (n = 3)	Keine Färbung: 1 x
	Nur <i>Ektoderm</i> (partiell): -
	Nur <i>Ektoderm</i> (komplett): 2 x
	<i>Ektoderm</i> und <i>Mesoderm</i> : -
2 Minuten (n = 5)	Keine Färbung: 2 x
	Nur <i>Ektoderm</i> (partiell): 1 x
	Nur <i>Ektoderm</i> (komplett): 2 x
	<i>Ektoderm</i> und <i>Mesoderm</i> : -
3 Minuten (n = 4)	Keine Färbung: -
	Nur <i>Ektoderm</i> (partiell): -

	<p>Nur <i>Ektoderm</i> (komplett): 3 x</p> <p><i>Ektoderm</i> und <i>Mesoderm</i>: 1 x</p>
4 Minuten (n = 4)	<p>Keine Färbung: -</p> <p>Nur <i>Ektoderm</i> (partiell): 2 x</p> <p>Nur <i>Ektoderm</i> (komplett): 1 x</p> <p><i>Ektoderm</i> und <i>Mesoderm</i>: 1 x</p>

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Einsetzbarkeit der von mir entwickelten Technik

Der Einsatz von phototoxischen Reaktionen ist eine vielversprechende Methode zur selektiven Entfernung von Zellverbänden. Ihr Einsatz hängt in hohem Maße von der Verfügbarkeit von Techniken ab, mit denen sich der zu entfernende Zellverband mit einem phototoxischen Stoff selektiv beladen lässt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine möglichst leicht zu handhabende Technik zu entwickeln, mit der es möglich ist, in Größe und Form klar definierte Areale des *Ektoderms* von Hühnerembryonen in ovo mit dem phototoxischen Farbstoff Bengalrosa anzufärben. Weiterhin sollte die von mir entwickelte Technik auf ihre Verlässlichkeit hin geprüft werden. Meine Wahl fiel auf eine Färbetechnik, die sich im weitesten Sinne als „Stempeltechnik“ bezeichnen lässt. Ein Mikrostempel von klar definierter Größe und Form lässt sich außerhalb eines Hühnereies relativ einfach unter lupenoptischer (Stereolupe) Kontrolle herstellen. Als besonders geeignete Materialien für derartige Stempel erschienen mir Membranen von definierter Dicke zu sein, die man durch Beschneiden mit mikrochirurgischen Scheren in Stücke von definierter Form und Größe trimmen kann. Um als Stempel fungieren zu können, sollten derartige Membranen den Farbstoff Bengalrosa einerseits nicht nur aufnehmen, sondern andererseits auch wieder abgeben können. Weiterhin sollte sich der Stempel nach dem Aufbringen auf die Oberfläche der Dotterkugel ohne Verletzung von Dottermembran und Embryo wieder entfernen lassen. Im Vorfeld der Experimente, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, führte ich daher Testreihen durch, bei denen Membranen aus verschiedenen Materialien (Eischalenmembran, Agar-Agar-Scheibchen, Blattgelatine, Filterpapier, Nitrozellulosemembran) darauf hin untersucht wurden, ob sie (1.) Bengalrosa aufnehmen und im wässrigen Milieu auch wieder abgeben können und (2.), ob sie sich nach Aufbringen auf die

Dotterkugel verletzungsfrei wieder entfernen lassen (nicht dokumentierte Ergebnisse). In diesen Testreihen zeigte sich, dass industriell gefertigte Nitrozellulosemembranen beide Anforderungen erfüllen, weshalb die Wahl des Stempelmaterials auf eine derartige Membran fiel.

Die in der vorliegenden Dissertationsschrift beschriebenen Experimente dienten zum einen der Entwicklung eines Modus, mit dem eine mit Bengalrosa beladene Nitrozellulosemembran auf die Dottermembran aufgebracht wird, um eine selektive Färbung des darunterliegenden *Ektoderms* zu erreichen. Des Weiteren sollte mittels intravitale Trypanblau (TB)-Färbung geklärt werden, ob eine Anfärbung des Embryos mit Bengalrosa auch zu den gewünschten zytotoxischen Effekten führt und bei welchem Applikationsmodus die zytotoxischen Effekte auf das *Ektoderm* beschränkt bleiben, d. h. aufgrund der Diffusion von Bengalrosa keine tiefer gelegenen Gewebsschichten (*Mesoderm*, *Endoderm*) in Mitleidenschaft ziehen. Meine Befunde zeigen, dass ein Nitrozellulosemembranstempel in der Tat dazu geeignet ist, ein in Form und Größe klar definiertes Areal des *Ektoderms* mit Bengalrosa anzufärben (Abb. 3 A, B). Die Dokumentation des phototoxischen Effektes mittels TB zeigte weiterhin, dass es in den mit Bengalrosa gefärbten Arealen, wie gewünscht, zum Absterben der angefärbten Zellen kommt (Abb. 5). Um den phototoxischen Effekt auf das *Ektoderm* zu beschränken, durfte die Färbedauer (= Auflagezeit der Membran) zwei Minuten nicht überschreiten (Abb. 6 A, B, C). Bei Embryonen, bei denen die Färbedauer länger als 2 Minuten (3 + 4 Minuten) betrug, konnten phototoxische Effekte nicht nur im *Ektoderm*, sondern auch im daran angrenzenden *Mesoderm* gefunden werden (Abb. 6 D), was durch Tiefendiffusion von Bengalrosa erklärt werden kann.

Somit konnte ich zeigen, dass sich die von mir entwickelte Technik prinzipiell zur

räumlich selektiven Elimination von *Ektodermarealen* im Hühnerembryo eignet. Bei wiederholter Anwendung in mehreren aufeinander folgenden Experimenten zeigte sich allerdings auch, dass (1.) eine kräftige Anfärbung der gestempelten Fläche mit Bengalrosa nicht in jedem Fall zum gewünschten zytotoxischen Effekt im *Ektoderm* führte und (2.), dass es selbst nach 2-minütiger Einwirkzeit vorkam, dass es im *Ektoderm* nur partiell zum Absterben von Zellen gekommen war. Somit wurde deutlich, dass die von mir entwickelte Technik zur Photoablation von *Ektodermarealen* bei wiederholter Anwendung unter gleichen Bedingungen leider keine gleichbleibenden Ergebnisse liefert. Sie ist daher in ihrer derzeitigen Form nicht als Ersatz für traditionelle mikrochirurgische Verfahren zur Elimination von *Ektodermarealen* geeignet.

4.2 Mögliche Ursachen für die Variation meiner Ergebnisse

In Bezug auf meine Untersuchungen stellt sich die Frage, welche Faktoren für die Variation meiner Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Eine Antwort auf diese Frage könnte genutzt werden, um meine Technik so abzuwandeln, dass sie auch bei wiederholter Anwendung immer gleichbleibende Ergebnisse liefert. Grundsätzlich sollten vier Hauptfaktoren in Betracht gezogen werden: (1.) Das Verhalten der als Stempel fungierenden Nitrozellulosemembran hinsichtlich der Aufnahme und Abgabe von Bengalrosa. (2.) Die Dicke des wässrigen Flüssigkeitsfilms über der Dottermembran. (3.) Operationstechnisch bedingte Unterschiede in der Lichtmenge, die das Operationsfeld erreicht und für die Photoaktivierung von Bengalrosa sorgt, sowie (4.) Unterschiede in der Beschaffenheit der Dottermembran, die die Tiefendiffusion von Bengalrosa beeinflussen könnten.

(1.) Eigenschaften der Nitrozellulosemembran: Bei der von mir entwickelten Färbetechnik fungiert ein Stückchen Nitrozellulosemembran als Stempel. Das

Färbeergebnis bei einem Stempelvorgang hängt von verschiedenen Faktoren ab, die die Aufnahme des verwendeten Farbstoffes auf die Stempeloberfläche sowie dessen Abgabe an die zu färbende Oberfläche beeinflussen. Einer dieser Faktoren ist die materielle Beschaffenheit des Stempels. Es ist somit denkbar, dass Variationen in der Beschaffenheit der von mir verwendeten Nitrozellulosemembran zu Abweichungen der Färbeergebnisse führten. Da es sich bei der von mir verwendeten Nitrozellulosemembran um ein unter standardisierten Bedingungen gefertigtes Industrieprodukt handelt, halte ich es allerdings für sehr unwahrscheinlich, dass Unterschiede in der materiellen Beschaffenheit der Membran für die o. g. Variationen der experimentellen Ergebnisse verantwortlich sind.

(2.) Beschaffenheit des Flüssigkeitsfilms über der Dottermembran: Das frisch gelegte Hühnerei besteht nicht nur aus der Eizelle des Huhns, der so genannten Dotterkugel oder des Eigelbs, sondern auch aus mehreren Hüllen, die im Legedarm (Eileiter) gebildet werden. Von innen nach außen sind dies: eine Dottermembran, eine innere Schicht dünnflüssigen Eiweißes, eine mittlere Schicht dickflüssigen Eiweißes, eine äußere Schicht dünnflüssigen Eiweißes, eine innere und äußere Schalenhaut sowie die Kalkschale (Salomon 1993). Um einen Hühnerembryo im Ei zu operieren, wird die Eischale (Kalkschale + Schalenmembranen) oberhalb der Dotterkugel gefenstert (siehe Material und Methoden). Hierbei kommt es zu einem Absinken der Dotterkugel, und das über ihr gelegene Eiweiß fließt zur Seite, sodass auf der zum Schalenfenster gelegenen Oberfläche der Dotterkugel lediglich ein dünner Flüssigkeitsfilm aus dünnflüssigem Eiweiß zurückbleibt. Bengalrosa ist ein wasserlöslicher Farbstoff. Seine Fähigkeit, sich von einer auf die Dottermembran gelegten Nitrozellulosemembran zu lösen und in die Umgebung zu diffundieren, hängt somit von der Menge an dünnflüssigem Resteiweiß auf der Dottermembran ab. Je dicker dieser wässrige Flüssigkeitsfilm ist, desto stärker diffundiert Bengalrosa

aus der Nitrozellulosemembran in die Umgebung. Somit ist denkbar, dass die Variation meiner Ergebnisse auf Unterschieden in der applizierten Menge von Bengalrosa (Färbeintensität) beruhen könnten, die wiederum ihre Ursache in Variationen der Beschaffenheit (Dicke) des Flüssigkeitsfilms haben könnten. Ich halte diese Erklärung allerdings für nicht zutreffend, da ich in meinen Experimenten Fälle beobachten konnte, bei denen ein phototoxischer Effekt ausblieb, obwohl das Auflegen der Nitrozellulosemembran zu einer intensiven Färbung des gestempelten Areals mit Bengalrosa geführt hat.

(3.) Belichtungsverhältnisse: Neben der applizierten Menge an Photosensibilisator hängt das Ausmaß eines phototoxischen Effektes natürlich auch von der Lichtmenge ab, die das angefärbte Zielgewebe erreicht. Es ist vorstellbar, dass diese Lichtmenge in meinen Experimenten von Operation zu Operation variiert haben könnte und es hierdurch, auch bei gleichbleibenden Färberegebnissen, zu der beobachteten Variation des phototoxischen Effektes kam. Dies halte ich jedoch für wenig wahrscheinlich, da ich in meinen Versuchen immer dieselbe Lichtquelle verwendet habe und die dokumentierten Operations- und damit auch die Belichtungszeiten nur geringfügig variierten.

(4.) Beschaffenheit der Dottermembran: Bei der von mir entwickelten Färbetechnik kommt die als Stempel fungierende Nitrozellulosemembran nicht in direkten Kontakt mit dem Zielgewebe (*Ektoderm*), sondern führt primär zu einer Anfärbung der über dem Embryo gelegenen Dottermembran. Letztgenannte Eihülle umhüllt die gesamte Dotterkugel. Sie schützt den Hühnerembryo vor äußeren Einwirkungen und verleiht dem Dotter und der Keimscheibe mechanische Stabilität. Hierin liegt ein Grund dafür, dass diese Membran in den vorliegenden Experimenten nicht verletzt oder entfernt werden sollte. Die Dottermembran besteht aus einer Vielzahl extrazellulärer Proteine, von denen einige homolog zu *Zona pellucida*-Proteinen des Säugereies sind (Mann 2008). Sie hat einen dreischichtigen Aufbau (Salomon 1993). Die innere und äußere

Schicht (*Lamina perivitellina* + *Lamina extravitellina*) besitzen eine faserige Struktur und dürften im Wesentlichen für die mechanische Festigkeit der Membran verantwortlich sein. Die mittlere Schicht (*Lamina continua*) zeigt eine gleichförmig granuläre Struktur. Die innere Schicht der Dottermembran wird vom *Follikel­epithel* hergestellt, während die mittlere und äußere Schicht im proximalen Abschnitt (*Infundibulum*) des Legedarms produziert werden. Im Unterschied zu Nitrozellulosemembranen handelt es sich bei der Dottermembran um ein biologisches Produkt. Sie dürfte daher bereits produktionsbedingt eine höhere biochemische und strukturelle Variabilität zwischen den Eiern einer Lieferung vorweisen als eine Charge erstgenannter, industriell gefertigter Membranen. Weiterhin ist zu bedenken, dass die chemische Zusammensetzung und Struktur der Dottermembran nach der Eiablage durch Umbauprozesse kontinuierlich verändert wird. Derartige Umbauprozesse betreffen sowohl bebrütete als auch unbebrütete, im Kühlschrank gelagerte Eier (Fromm 1967; Jensen 1969; Back 1984). Letztgenannter Punkt ist besonders hervorzuheben, da die für die Experimente verwendeten Hühnereier vor Beginn ihrer Bebrütung üblicherweise eine unterschiedlich lange Lagerzeit im Kühlschrank hinter sich haben. Angesichts der genannten Fakten bin ich zu der Schlussfolgerung gelangt, dass die in meinen Experimenten gefundene Variabilität im Ausmaß des phototoxischen Effektes am ehesten auf Unterschieden im chemischen und strukturellen Bau der Dottermembran zwischen den behandelten Embryonen beruhen könnte. Diese Unterschiede könnten sich auf die Aufnahmekapazität der Dottermembran für den Farbstoff Bengalrosa und damit auch auf deren Durchlässigkeit für diesen Farbstoff auswirken. So ließe sich z. B. das oben genannte Ausbleiben eines phototoxischen Effektes bei Embryonen, bei denen postoperativ eine intensive Färbung des gestempelten Areals mit Bengalrosa gesehen wurde, dadurch erklären, dass der Farbstoff nicht bis zur Keimscheibe diffundieren konnte, da sämtliche Farbstoffmoleküle bereits von Proteinen der

Dottermembran adsorbiert wurden.

4.3 Ausblick: Strategien zur Verbesserung der Technik

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass sich die von mir entwickelte Technik für die Anfärbung von *Ektoderm* mit dem phototoxischen Farbstoff Bengalrosa prinzipiell zur selektiven Photoablation von *Ektodermarealen* definierter Größe und Form eignet. Die Anwendung dieser Technik ist derzeit allerdings nicht zu empfehlen, da der phototoxische Effekt von Anwendung zu Anwendung sehr stark variiert. Die oben beschriebenen Überlegungen zu den möglichen Ursachen dieser Variabilität führten zu der Hypothese, dass die in meinen Experimenten beobachtete Variabilität im Ausmaß des phototoxischen Effektes hauptsächlich auf interindividuellen Unterschieden in der chemischen Zusammensetzung und der Struktur der Dottermembran beruhen könnten. Um die Verlässlichkeit meiner Operationstechnik zu verbessern, könnte man daher in zukünftigen Studien zunächst testen, ob die Verwendung von Eiern mit möglichst einheitlicher Zusammensetzung und Struktur der Dottermembran zu gleichbleibenderen Ergebnissen führt. Da es sich bei der Dottermembran um ein biologisches Produkt handelt, ist anzunehmen, dass deren Aufbau bei Eiern von verschiedenen Legehennen sowie bei unterschiedlicher Ernährung der Legehennen variieren dürfte. Weiterhin ist bekannt, dass sich die Zusammensetzung der Dottermembran nach der Eiablage kontinuierlich verändert (siehe oben). Um Eier mit einer möglichst gleichbleibenden Qualität der Dottermembran zu erhalten, könnte man daher in zukünftigen Studien Eier gleichen Alters (nach Eiablage) und vom selben Huhn verwenden. Allerdings wäre einzuwenden, dass beide Strategien mit den praktischen Erfordernissen einer experimentellen Embryologie mit hohen Fallzahlen nur schwer vereinbar sind. So legt eine Henne einer Hochleistungslegerasse wie *White Leghorn* lediglich ein Ei in 26 Stunden

(Rüsse und Sinowatz 1991), und der genaue Legezeitpunkt ließe sich nur mit einer kontinuierlichen Überwachung der Legehenne ermitteln.

Eine weitere Strategie zur Ausschaltung möglicher Dottermembranfaktoren wäre die Entfernung dieser Membran oberhalb des zu färbenden *Ektodermareals*. Hierdurch würde die, mit Bengalrosa beladene, Nitrozellulosemembran in direkten Kontakt mit dem *Ektoderm* der Keimscheibe kommen. Bei der anschließenden Entfernung der Nitrozellulosemembran, die sich stellenweise am *Ektoderm* festgesaugt hat, würde die sehr fragile Keimscheibe (Embryo) allerdings Gefahr laufen, zerrissen zu werden.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Zur Klärung der funktionellen Bedeutung von Gewebsarealen werden in der experimentellen Embryologie mikrochirurgische Techniken zur Entfernung der betreffenden Gewebsareale (z. B. *Ektodermareale*) angewendet. Traditionelle mikrochirurgische Verfahren sind mit einigen Nachteilen behaftet, die die Replizierbarkeit und Interpretation der Versuchsergebnisse erschweren. Die Anwendung von photoablativen Techniken verspricht einige Vorteile gegenüber traditionellen mikrochirurgischen. Bei photoablativen Techniken werden Kombinationen von zwei individuell nicht toxischen Komponenten appliziert, um Gewebsdefekte in Sauerstoff abhängiger Weise zu erzeugen. Bei solchen Komponenten handelt es sich um eine photoaktivierbare Substanz (Photosensibilisator) und um Licht einer bestimmten Wellenlänge, das diese Substanz anregt. Bei Anwesenheit von Sauerstoff werden durch die Anregung des Photosensibilisators Sauerstoffradikale erzeugt, die Zellen zerstören können (= phototoxischer Effekt). In der Vergangenheit wurden phototoxische Ablationsverfahren bereits erfolgreich in Wirbeltierembryonen eingesetzt.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren: (1.) Die Entwicklung einer leicht zu handhabenden Technik, die es ermöglicht, in Form und Größe klar definierte Areale des *Ektoderms* von Hühnerembryonen in ovo mit dem Photosensibilisator Bengalrosa anzufärben. (2.) Die Klärung der Fragen, ob sich (a) die von mir entwickelte Färbetechnik zur räumlich selektiven Eliminierung der angefärbten *Ektodermareale* eignet und (b), ob die Technik bei wiederholter Anwendung unter gleichen Bedingungen gleichbleibende Ergebnisse liefert.

Materialien und Methoden: Die Untersuchungen wurden an Hühnerembryonen in den Entwicklungsstadien HH-12 und HH-13 durchgeführt. Als Testareal diente das flache *Ektoderm* am *kaudalen* Ende des Rumpfes. Zur Anfärbung dieses Areal

mit Bengalrosa wurde eine Stempeltechnik entwickelt, die ein 1x1 mm großes mit Bengalrosa (1%ig) beladenes Nitrozellulosemembranstückchen als Stempel benutzt. Es wurden 5 unterschiedliche Versuchsreihen mit jeweils 10 Embryonen durchgeführt. Die Versuchsreihen unterschieden sich in der Auflagedauer des mit Bengalrosa beladenen Membranstückchens (0,5 Min, 1,0 Min., 2,0 Min., 3,0 Min., 4,0 Min.). Das Ausmaß der Anfärbung mit BR wurde in direktem Anschluss an die Operation in ovo photographisch dokumentiert. Der Nachweis des zytotoxischen Effektes erfolgte mittels Trypanblauausschlusstest nach 2-stündiger Reinkubation und die photographische Dokumentation der Flächenausdehnung des phototoxischen Effektes (TB-Färbung) am *whole-mount*-Präparat unter der Stereolupe. Die Analyse der Tiefenausdehnung des phototoxischen Effektes (TB-Färbung) wurde an histologischen Schnitten mittels Durchlichtmikroskopie durchgeführt.

Befunde: Es zeigte sich, dass ein Nitrozellulosemembranstempel dazu geeignet ist, ein in Form und Größe klar definiertes Areal des *Ektoderms* mit BR anzufärben. Der TB-Ausschlusstest ergab, dass es in den mit Bengalrosa gefärbten Arealen zum Absterben der angefärbten Zellen kommt. Um den phototoxischen Effekt auf das *Ektoderm* zu beschränken, durfte die Auflagezeit der Membran zwei Minuten nicht überschreiten. Bei längerer Färbedauer (3 + 4 Minuten) konnten phototoxische Effekte nicht nur im *Ektoderm*, sondern auch im angrenzenden *Mesoderm* gefunden werden. Bei wiederholter Anwendung in mehreren aufeinander folgenden Experimenten wurde ersichtlich, dass (1.) eine kräftige Anfärbung der gestempelten Fläche mit Bengalrosa nicht in jedem Fall zum gewünschten zytotoxischen Effekt im *Ektoderm* führte und (2.) dass es selbst nach 2-minütiger Einwirkzeit vorkam, dass es im *Ektoderm* nur partiell zum Absterben von Zellen gekommen war.

Schlussfolgerungen: Die von mir entwickelte Technik zur Photoablation eignet sich prinzipiell zur selektiven Elimination von *Ektodermarealen*. Allerdings liefert

diese Technik bei wiederholter Anwendung unter gleichen Bedingungen keine gleichbleibenden Ergebnisse. Somit ist diese Technik in ihrer derzeitigen Form nicht als Ersatz für traditionelle mikrochirurgische Verfahren zur Elimination von *Ektodermarealen* geeignet. Die möglichen Gründe für die Variation der Ergebnisse wurden diskutiert. Als wahrscheinlichste Ursache sind Unterschiede in der Beschaffenheit der Dottermembran anzusehen, die durch ein unterschiedliches Lagerungsalter der Eier bedingt sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Back JF (1984): Changes in the Proteins of the vitelline Membrane of hen`s eggs during storage. *Biochim Biophys Acta* 799, 319-321
2. Brade T, Pane LS, Moratti A, Chien KR, Laugwitz KL (2013): Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a013847
3. DeHaan RL (1964): Cell interactions and oriented movements during development. *J Expo Zool* 157, 127-138
4. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK (2003): Photodynamic therapy for cancer. *Nature Rev Cancer* 3, 380-387
5. Ettensohn CA (1990): Cell interactions in the sea urchin embryo studied by fluorescence photoablation. *Science* 248, 1115-1118
6. Fromm D (1967): Some physical and chemical changes in the vitelline membrane of the hen`s eggs during storage. *Food Science* 32, 52-56
7. Gilbert SF: *Developmental Biology*, 6.Auflage. Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts 2000
8. Grossfeld J: *Handbuch der Eierkunde*. Verlag Julius Springer, Berlin 1938
9. Hamburger V (1946): Isolation of the brachial segments of the spinal cord of the chick embryo by means of Tantalum foil blocks. *J Exp Zool* 103, 113-142
10. Hamburger V, Hamilton HL (1951): A series of normal Stages in the development of chick embryo. *J Morphol* 88, 897-904
11. Hara K (1971): Micro-surgical operation on the chick embryo in ovo without vital stain. A modification of the intra-coelomic grafting technique. *Mikroskopie* 27, 267-270
12. Jensen C (1969): Ultrastructural changes in the avian vitelline membrane during embryonic development. *J Exp Morph* 21, 464-484

13. Le Douarin NM (1973): A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol* 30, 217-222
14. Le Lièvre CS, Le Douarin NM (1975): Mesenchymal derivatives of neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34, 125-154
15. Lemaigre F, Zaret KS (2004): Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 14, 582-590
16. Mann K (2008): Proteomic Analysis of chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* 8, 2322-2332
17. Männer J (1992): The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat Embryol* 186, 379-385
18. Männer J (1993): Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol* 187, 281-289
19. Männer J (2013): Microsurgical procedures for studying the developmental significance of the proepicardium and epicardium in avian embryos: pe-blocking, pe-photoablation, and pe-grafting. *J Dev Biol* 1, 47-63
20. Männer J, Seidl W, Steding G (1996): Experimental study on the significance of abnormal cardiac looping for the development of cardiovascular anomalies in neural crest-ablated chick embryos. *Anat Embryol* 194, 289-300
21. Männer J, Pérez-Pomares JM, Macías D, Muñoz-Chápuli R (2001): The origin, formation and developmental significance of epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 169, 89-103
22. Männer J, Schlueter J, Brand T (2005): Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn* 233, 454-463

23. Menon IA, Basu PK, Persad SD, Rosatone S, Wiltshire JD (1989): A study on the sequence of phototoxic effects of rose bengal using retinal pigment epithelial cells in vitro. *Exp Eye Res* 49, 67–73
24. Moan J, Peng Q (2003): An Outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res* 23, 3591-3600
25. Nishida H, Satoh N (1989): Determination and regulation in the pigment cell lineage of the ascidian embryo. *Dev Biol* 132, 355-367
26. Rüsse I, Sinowatz F: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey, Berlin Hamburg 1991
27. Saini R, Pah CF (2013): Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potential malignant disorders. *Oral Diseases* 19, 440-451
28. Salomon F-V: *Lehrbuch der Geflügelanatomie*. G.Fischer Verlag, Jena Stuttgart 1993
29. Schoenwolf GC (2001): Cutting, posting and painting: experimental embryology and neural development. *Nature Rev Neurosci* 2, 763-771
30. Sellner W: Herstellung und Untersuchung unfixierter Präparate. In: Böck P(Hrsg.): *Romeis Mikroskopische Technik*. 17. Auflage; Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore 1989, 21-36
31. Shankland M (1984): Positional determination of supernumerary blast cell death in the leech embryo. *Nature* 307, 541-543
32. Steding G, Seidl W (1980): Contribution to the development of the heart. Part I. Normal development. *Thorac Cardiovasc Surg* 28, 386-409
33. Thiel CT (2012): Pränatale genetische Diagnostik bei ZNS-Fehlbildung. *Frauenheilkunde up2date* 6, 375-389
34. Virágh S, Challice CE (1981): The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 201, 157–168

-
35. Virágh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kálmán F (1993): Early development of the quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol* 188, 381–393
36. Weaver M, Hogan B (2001): Powerful ideas driven by simple tools: lessons from experimental embryology. *Nature Cell Biol* 3, E165-E167

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle **Herrn PD Dr. J. Männer** für die Vergabe des Dissertationsthemas und die sehr wertvolle, konstruktive und beispielhafte Unterstützung und Betreuung.

Seine Aufgeschlossenheit und die angenehme Atmosphäre führten zu unermüdlichen und fruchtbringenden Diskussionen. Aus diesen schöpfte ich stets neue Ideen für die anfänglichen Entwürfe meiner vorliegenden Dissertation.

Darüber hinaus danke ich **Herrn H.G. Sydow** für die kompetente und unermüdliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor, der phototechnischen Hilfe sowie für die ständig motivierenden Worte und Gespräche.

Mein Dank geht auch an **Frau Kirsten Falk- Stietenroth** für die Hilfe und Unterstützung bei der Herstellung der histologischen Schnittserien.

Lebenslauf

Am 13.10.1986 wurde ich, Janine Döring, als zweites Kind von Werner Döring und Dr. Anna-Maria Döring, geb. Volkmar, in Heilbad Heiligenstadt geboren.

Vom Herbst 1993 bis Sommer 1997 besuchte ich die Staatliche Grundschule Pfaffschwende. Anschließend wechselte ich zum Johann- Georg- Lingemann - Gymnasium in Heilbad Heiligenstadt, wo ich im Jahr 2005 das Abitur ablegte.

Ab dem Wintersemester 2005/06 studierte ich Zahnmedizin an der Georg -August -Universität in Göttingen.

Im Frühjahr 2013 begann ich mit der Arbeit an meiner Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Institut für Anatomie und Embryologie bei PD Dr. med. J. Männer.

Im Juni 2014 erhielt ich meine Approbation als Zahnärztin. Von September 2014 bis 31.10.2017 arbeitete ich in der Zahnarztpraxis Dr. Olaf Peterseim in Mühlhausen.

Von Oktober 2015 bis Juli 2016 absolvierte ich erfolgreich das Curriculum Kieferorthopädie bei PD Dr. Sander in Frankfurt/ Main. Am 22.02. 2017 wurde mein Sohn Matheo geboren.

Seit 01.11.2017 arbeite ich in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. Folker Schlesier und Dr. med. dent. Ludwig Schlesier in Heilbad Heiligenstadt.