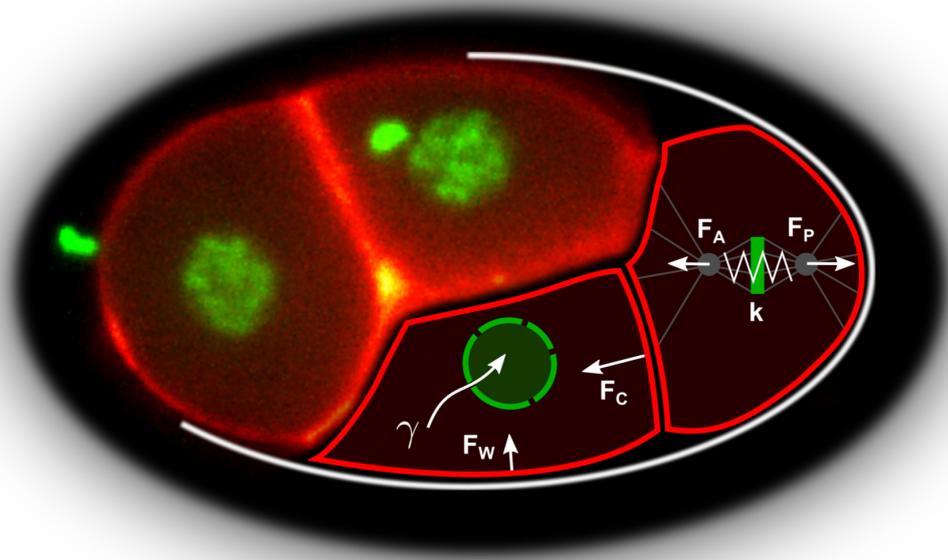


— Dissertation —

Über die Dynamik der frühen Embryogenese des *Caenorhabditis elegans*



Rolf Fickentscher

Über die Dynamik der frühen Embryogenese des *Caenorhabditis elegans*

Von der Universität Bayreuth
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

von
Rolf Fickentscher
aus
Marktredwitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Weiss
2. Gutachter: Prof. Dr. Axel Enders
3. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Grill

Tag der Einreichung: 26.03.2018

Tag des Kolloquiums: 27.07.2018

Zusammenfassung

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist einer der wichtigsten Modellorganismen für die moderne Entwicklungsbiologie. Der Grund hierfür ist die hohe Reproduzierbarkeit der ablaufenden Prozesse. So sind zum Beispiel Zelltrajektorien und Eigenschaften der Zellteilungen in allen Individuen nahezu invariant. In dieser Arbeit wird nach Gründen für diese Wiederholgenauigkeit gesucht. Sie baut auf einem vorbestehenden mechanischen Modell auf, mit welchem die Zelltrajektorien reproduziert werden können [1, 2]. In diesem Modell streben Zellen Positionen entgegen, an welchen möglichst wenig repulsive Kräfte von anderen Zellen oder der Eihülle auf sie einwirken. Eigenschaften der Zellteilungen können damit jedoch nicht erklärt werden. Um weitere Einblicke zu gewinnen, wird die Embryogenese des *Caenorhabditis elegans* in dieser Arbeit mittels Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie vierdimensional verfolgt. Anhand der Aufnahmen können Zellpositionen und -größen zeitabhängig quantifiziert werden. Mittels der so gewonnenen Daten wird gezeigt, dass die starre Chitinhülle, die den Embryo umgibt, für deterministische Zelltrajektorien essentiell ist. Weiterhin kann gezeigt werden, dass Schwankungen der Umgebungstemperatur keinen Einfluss auf die beobachteten Zellanordnungen haben. Die geometrischen Asymmetrien der Zellteilungen werden in dieser Arbeit erstmals gemessen. Es zeigt sich, dass sich etwa 40% aller frühen Zellen asymmetrisch teilen. Während dies in somatischen Zellen durch sterische Effekte induziert wird, treten Asymmetrien in Keimbahnzellen aufgrund einer Verschiebung der mitotischen Spindel auf. Diese Verschiebung ist von der Zellgröße entkoppelt, was durch ein mechanisches Modell erklärt werden kann. Weiterhin wird die Größe der Zellkerne während der Interphase untersucht. Es zeigt sich, dass Nuklei exponentiell-asymptotisch wachsen, wobei der Grenzwert linear vom Zellvolumen abhängt. Das Wachstum ist temperaturunabhängig und läuft in kleineren Zellen schneller ab. Insgesamt deuten die Daten auf einen diffusionsbasierten Partitionierungsmechanismus einer limitierenden Komponente hin. Außerdem zeigen die Zellzyklendauern, d.h. die Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen, eine Antikorrelation mit den Zellvolumina. Dieses Verhalten kann ebenso über ein Modell limitierender Komponenten quantitativ erfasst werden. Mittels dieser Ergebnisse kann das mechanische Modell zur Zellanordnung erweitert werden. Damit kann schließlich gezeigt werden, dass Abweichungen von den ungestörten Eigenschaften der Zellteilungen zu einer erhöhten Instabilität der Embryogenese führen.

Abstract

The small nematode *Caenorhabditis elegans* is one of the major model systems in modern developmental biology due to its almost invariant embryogenesis. For example, cell trajectories and many properties of cell divisions are almost the same for each individual. This thesis aims at elucidating the reasons for the observed reproducibility, based on a previously established mechanical model that reproduces experimentally obtained cell trajectories [1, 2]. Within this model, cell organization is determined by the cells' quest for positions with least repulsive interactions among themselves and the eggshell. Since this model cannot capture properties of cell divisions, the embryogenesis of *Caenorhabditis elegans* has been observed by fluorescence light sheet microscopy in four dimensions. The acquired data allow the quantification of cell positions and volumes in a time-dependent manner. These data reveal that the rigid chitin eggshell surrounding the embryo is crucial for deterministic cell trajectories. Furthermore, fluctuations in the ambient temperature only rescale the biological clock without influencing cell arrangements qualitatively. Geometric asymmetries of cell divisions are quantified for the first time. It turns out that around 40% of early cell divisions are significantly asymmetric. While this is induced by steric effects in somatic cells, asymmetries in the germline are caused by a shift of the mitotic spindle. The magnitude of this shift is decoupled from cell size, which can be explained by a mechanical model. In addition, the volumes of cell nuclei during interphase are quantified. Nuclei grow with an exponential scaling towards asymptotic volumes that correlate linearly with cell volumes. Growth is independent of temperature and faster in small cells. Hence, data suggest a diffusion-based partitioning mechanism of a limiting component. Furthermore, it is shown that cell cycle durations, i.e. the time between two successive cell divisions, are anticorrelated with cell volumes. This scaling can also be rationalized quantitatively with a model based on limiting components. With these results the mechanical modelling of cell trajectories can be formulated in a significantly more self-contained fashion. Finally, using that model, it can be shown that deviations from unperturbed properties of cell divisions markedly reduce the stability of embryogenesis.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	1
1. Einleitung	3
1.1. Biologischer Hintergrund	5
1.1.1. Die eukaryotische Zelle	5
1.1.2. Der Zellzyklus	7
1.1.3. Das Modellsystem <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
1.1.4. Modellierung der Zellanordnung in <i>C. elegans</i>	15
1.2. Fluoreszenz- und Lichtblattmikroskopie	22
1.2.1. Fluoreszenz, Fluoreszenzmikroskopie und Lichtblattmikroskopie	22
1.2.2. Beschreibung des Aufbaus	27
2. Material & Methoden	33
2.1. Experimentelle Materialien und Methoden	33
2.1.1. Wurmlinien und -kultur	33
2.1.2. Probenpräparation und Bildaufnahmen	34
2.1.3. Temperaturkontrolle	36
2.1.4. RNA-Interferenz	36
2.1.5. Entfernung der Chitinhülle	37
2.2. Datenanalyse	38
2.2.1. Tracking der Zellnuklei	38
2.2.2. Segmentierung der Zellmembranen	45
2.2.3. Bestimmung der Nukleusvolumen während der Interphase	51
3. Ergebnisse & Diskussion	55
3.1. Einfluss der Rand- und Umgebungsbedingungen	56
3.1.1. Temperaturabhängigkeit der Zellbewegung	56
3.1.2. Bedeutung der starren Eihülle	60
3.2. Zellvolumina während der frühen Embryogenese	64
3.2.1. Zellvolumina in ungestörten Embryonen	65
3.2.2. Embryonale Gesamtvolumina in gestörten Embryonen	67
3.3. Geometrisch asymmetrische Zellteilungen	69
3.3.1. Einleitung	69
3.3.2. Ergebnisse	72

3.3.3. Diskussion	91
3.4. Nukleusgrößen während der frühen Entwicklung	94
3.4.1. Einleitung	95
3.4.2. Ergebnisse	98
3.4.3. Diskussion	110
3.5. Zellzyklendauern während der frühen Entwicklung	113
3.5.1. Einleitung	113
3.5.2. Ergebnisse	117
3.5.3. Diskussion	139
3.6. Generalisierung des Modells zur Zellanordnung	142
3.6.1. Einleitung	142
3.6.2. Ergebnisse	143
3.6.3. Diskussion	158
4. Fazit & Ausblick	161
4.1. Fazit	161
4.2. Ausblick	162
A. Anhang	167
A.1. Embryonische Rotationen	167
A.2. Mitotische Zellrundung	168
A.3. Implementierung der Simulation	171
Abkürzungsverzeichnis	175
Abbildungsverzeichnis	177
Tabellenverzeichnis	179
Literatur	181

Artikel (peer-reviewed)

Auszüge dieser Arbeit wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

1. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss,
Setting the Clock for Fail-Safe Early Embryogenesis.
Physical Review Letters **117** (2016), S. 188101.
2. R. Fickentscher und M. Weiss,
*Physical determinants of asymmetric cell divisions in the early development of *Caenorhabditis elegans*.*
Scientific Reports **7** (2017), S. 9369.

Zwei weitere Publikationen über die Ergebnisse dieser Arbeit befinden sich derzeit in Vorbereitung. Weitere Artikel des Autors, die während der Erstellung dieser Arbeit veröffentlicht wurden, sind:

3. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss,
*Mechanical cues in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*.*
Biophysical Journal **105** (2013), S. 1805-1811.
4. M. Safra, R. Fickentscher, M. Levi-Ferber, Y. M. Danino, A. Haviv-Chesner, M. Hansen, T. Juven-Gershon, M. Weiss und S. Henis-Korenblit,
The FOXO transcription factor DAF-16 bypasses ire-1 requirement to promote endoplasmic reticulum homeostasis.
Cell Metabolism **20** (2014), S. 870-881.
5. J. Hoffmann, R. Fickentscher und M. Weiss,
Influence of organelle geometry on the apparent binding kinetics of peripheral membrane proteins.
Physical Review E **91** (2015), S. 022721.

Ausgewählte Konferenzbeiträge

1. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Mechanical cues during the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**.
Poster auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Dresden, April 2014
2. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Mechanical cues during the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**.
Poster auf dem BioSoft Symposium in Jülich, November 2014
3. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Analysis of cellular arrangements and shapes in *Caenorhabditis elegans**.
Poster auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Berlin, März 2015
4. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Exploring the driving forces of cellular motion in early embryos of *Caenorhabditis elegans**.
Poster auf der BIOMS|EMBL Conference - Physics of Cells and Tissues in Heidelberg, Oktober 2015
5. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Driving forces of cellular arrangement during the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**.
Vortrag auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Regensburg, März 2016
6. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Spatiotemporal organisation during the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**.
Poster auf der 3rd Light Sheet Fluorescence Microscopy International Conference in Sheffield, UK, September 2016
7. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *Robust early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans* due to mechanical cues and proper cell division timing*.
Poster auf dem 61st Annual Meeting der Biophysical Society in New Orleans, Louisiana, USA, Februar 2017
8. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *How cell division timing leads to robust development in *Caenorhabditis elegans**.
Vortrag auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Dresden, März 2017
9. R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss, *SPIM imaging reveals mechanisms for the robust development of *Caenorhabditis elegans**.
Vortrag auf der 4th Light Sheet Fluorescence Microscopy International Conference in Singapur, Juni 2017
10. R. Fickentscher, T. Ozawa, A. Kimura und M. Weiss, *Growth dynamics of interphase nuclei during the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**.
Poster auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Berlin, März 2018

Unser Wissen ist ein kritisches Raten,
ein Netz von Hypothesen,
ein Gewebe von Vermutungen.

Karl Popper

Die Fortschritte in der grundlegendsten aller Naturwissenschaften, der Physik, sind eine erstaunliche Erfolgsgeschichte. Allein im letzten Jahrhundert konnte das Verständnis von Prozessen im Mikrokosmos bis hin zu solchen auf sehr großen Längenskalen vervielfacht werden. Ein Garant für den Erfolg physikalischer Forschung ist dabei die Fähigkeit zur Komplexitätsreduktion: die betrachteten Systeme werden so lange vereinfacht, bis eine theoretische Beschreibung möglich wird. Für genauere Theorien werden weitere Einflussfaktoren hinzugenommen und die Beschreibung angepasst. Durch Iteration dieses Vorgehens kann so ein immer tieferes Verständnis der betrachteten Prozesse gewonnen werden.

In der biologischen Forschung, insbesondere in der Zell- und Entwicklungsbiologie, lassen sich Systeme in ihrer Komplexität hingegen nicht beliebig reduzieren. Selbst die einfachsten natürlichen Organismen verfügen immer noch über mindestens 500 Gene, d.h. ähnlich viele miteinander wechselwirkende Proteinfamilien. Die Anzahl der einzelnen Proteine liegt viel höher. Bei vielzelligen Lebewesen kommt hierzu noch eine große Anzahl an Zellen (etwa 10^{13} beim Menschen). Eine grundlegende Beschreibung aller ablaufenden basalen Prozesse und Abhängigkeiten ist somit (noch) nicht möglich.

Die moderne biologische Forschung ist daher auf relativ wenige Modellorganismen fokussiert. Diese sind in der Regel recht einfache Organismen, die die zu untersuchenden Phänomene in reduzierter Komplexität zeigen. Ein wichtiger Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie ist der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Das herausragendste Merkmal dieser Art ist seine extrem wiederholgenaue Entwicklung: jedes adulte Individuum hat dieselbe Anzahl an somatischen Zellen (959 bei Hermaphroditen, 1031 bei Männchen). Auch die embryonale Entwicklung zeichnet sich durch eine stereotype Abfolge (mesoskopischer) Prozesse aus. Die Anordnung der Zellen, deren Teilungszeitpunkte und -achsen sowie die Zellkern- und Zellgrößen zeigen kaum Variation, so dass die Entwicklung insgesamt beinahe deterministisch wirkt. Dies ist in Abb. 1.1 anschaulich dargestellt. Abgebildet sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier sich entwickelnder Individuen, wobei die Zellkerne als helle Strukturen erscheinen.

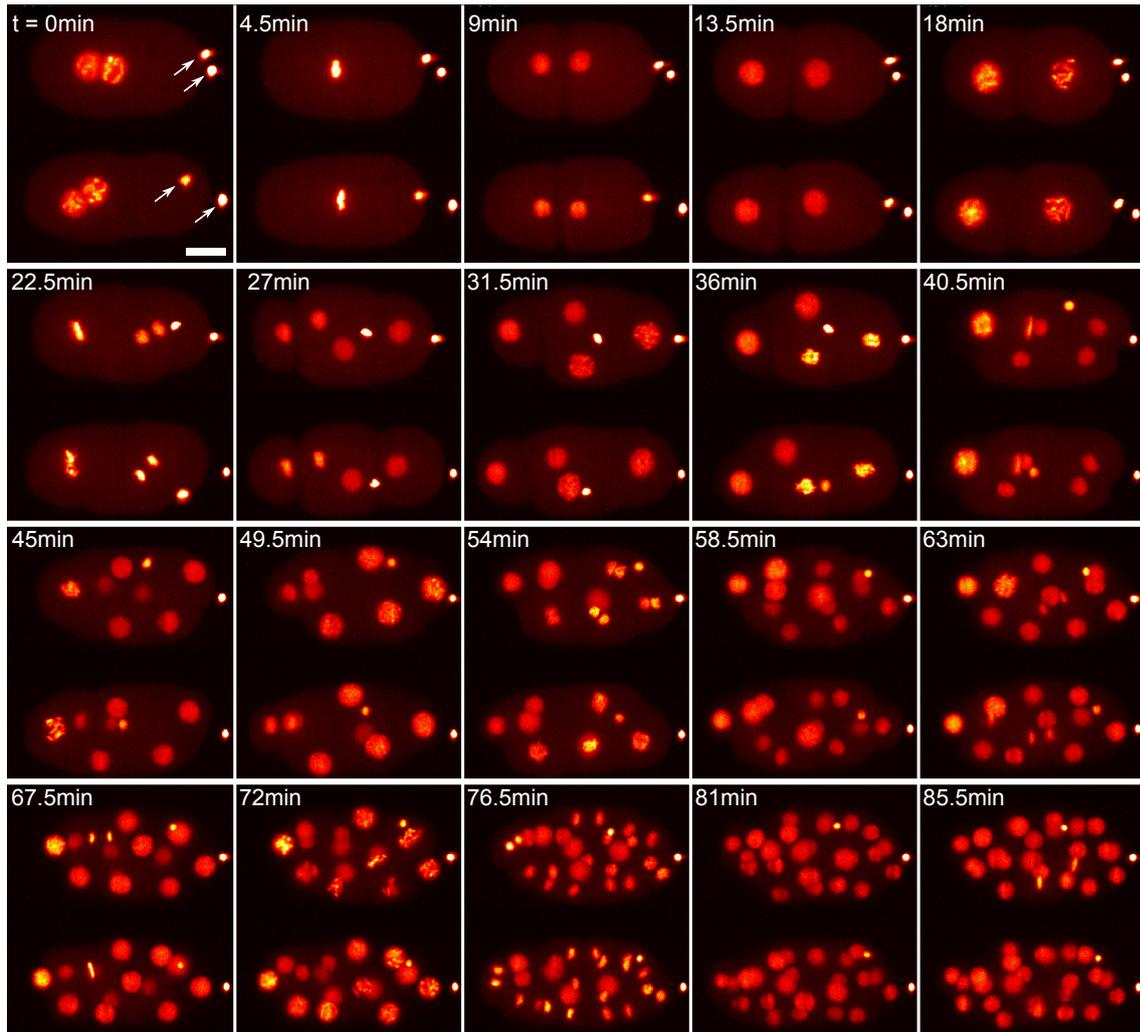


Abbildung 1.1.: Zeitreihe zweier sich entwickelnder *Caenorhabditis elegans* Embryonen. Jede Kachel zeigt zwei Embryonen zu korrespondierenden Zeitpunkten. Die zeitliche Ausrichtung erfolgte dabei anhand eines einzigen Zeitpunktes (der ersten Zellteilung, zweite Kachel). Die hellen Strukturen sind Zellkerne (groß) bzw. für die Entwicklung irrelevante Polkörperchen (klein, Pfeile in der ersten Kachel). Zu Beachten ist der nahezu gleiche Ablauf der Entwicklung in beiden Embryonen in Bezug auf Zell(kern)positionen, Teilungszeiten, Teilungsachsen, Zell(kern)größen. Längenskala 10 μm .

Die Wiederholgenauigkeit wird dabei oft ausgenutzt, so kann z.B. eine Änderung des stereotypen Verhaltens infolge der Ausschaltung eines Gens Hinweise auf die Funktion dieses Gens liefern. Die Gründe für die Wiederholgenauigkeit sind jedoch nicht ansatzweise verstanden. Wie kann es also sein, dass ein derart einfaches Lebewesen wie *Caenorhabditis elegans* eine solchermaßen robuste Entwicklung zeigt? Eine mögliche Erklärung ist, dass die ablaufenden Prozesse hochgradig reguliert sind. In Anbetracht der kurzen Zeitskalen (siehe Abb. 1.1) erscheint dies jedoch unwahrscheinlich. Eine andere Möglichkeit der Selbstorganisation ist, dass die Prozesse auf sehr einfachen Prinzipien beruhen.

An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an. Mit physikalischen Methoden (quantitative Fluoreszenzmikroskopie, Modellbildung an komplexitätsreduzierten "Ersatzschaltbildern" der Zellen, Signalkaskaden etc.) sollen die Gründe für die Robustheit der frühen Phase der Embryonalentwicklung untersucht werden. Die Arbeit baut dabei stark auf der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors auf [1]. Hier wurde ein mechanisches Modell

entwickelt, mit dem die Zellanordnung verständlich gemacht werden kann. Dieses Modell ist jedoch stark von experimentell bestimmten Parametern abhängig und soll daher weiterentwickelt und somit eigenständiger werden.

In diesem Kapitel werden die hierfür nötigen Grundlagen eingeführt. Im ersten Teil erfolgt eine Diskussion des biologischen Hintergrundes, der zweite Teil führt die verwendete experimentelle Technik der Lichtblattmikroskopie ein. Kap. 2 behandelt alle verwendeten experimentellen Methoden sowie die zur Auswertung der Mikroskopiedaten entwickelten Algorithmen. Die damit gewonnenen Ergebnisse werden ausführlich in Kap. 3 behandelt, wobei jedes Unterkapitel in eine Einleitung, einen Ergebnisteil sowie eine Zusammenfassung und Diskussion gegliedert ist. In Kap. 4 erfolgt schließlich ein Fazit und ein Ausblick.

1.1. Biologischer Hintergrund

In diesem Abschnitt werden knapp die für das weitere Verständnis benötigten biologischen Grundlagen dargelegt. Hierzu werden zuerst die wichtigsten Strukturelemente eukaryotischer Zellen sowie der Zellzyklus behandelt. Danach wird der in dieser Arbeit untersuchte Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) eingeführt, zuerst mit einer allgemeinen Charakterisierung und anschließend mit einer Zusammenfassung wichtiger Vorgänge während der Embryonalentwicklung. Abschließend wird ein mechanisches Modell für die Anordnung der Zellen während der frühesten Embryogenese des *C. elegans* vorgestellt, das während der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors entwickelt wurde und für diese Arbeit eine Grundlage darstellt. Zudem wird die Weiterentwicklung jenes Modells durch K. Yamamoto und A. Kimura besprochen.

1.1.1. Die eukaryotische Zelle

Zellen sind die kleinste eigenständige Organisationseinheit aller Lebewesen. Wie alle vielzelligen Lebewesen verfügt auch *C. elegans* über sog. eukaryotische Zellen, deren bestimmendes Merkmal das Vorhandensein eines Zellkerns ist. An dieser Stelle sollen die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtigen Strukturelemente eukaryotischer Zellen eingeführt werden. Auf die Diskussion weiterer Zellorganellen, wie etwa des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien, Ribosomen etc., wird dabei verzichtet und auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen (z.B. [3]). Eine schematische Zeichnung einer eukaryotischen Zelle ist in Abb. 1.2a gezeigt, Abb. 1.2b zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zygote (befruchtete Eizelle) des *C. elegans* während der ersten Zellteilung, wobei hier die DNA und das Cytoskelett markiert sind.

Die äußere Begrenzung einer jeden Zelle bildet die Zell- oder Plasmamembran. Sie besteht hauptsächlich aus einer Doppellipidschicht (Dicke (5 - 10)nm) sowie darin gebundener Proteine. Über die Plasmamembran erfolgt auch ein Stoffaustausch der Zelle mit ihrer Umgebung [3]. Unterhalb der Plasmamembran und über sog. Ankerproteine mit dieser verbunden schließt sich der Zellkortex an, ein aktives Netzwerk aus Aktinfilamenten (Durchmesser 7 nm) und Myosin-Motorproteinen [5]. Dieser hochgradig dynamische Aktomyosinkortex kann kontraktile Kräfte generieren und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellform sowie bei Zellteilungen.

Der Aktomyosinkortex ist Teil des sog. Cytoskeletts. Ein weiterer wichtiger Bestandteil desselben sind die Mikrotubuli. Diese sind zylinderförmige Filamente, die aus den Monomeren α - und β -Tubulin aufgebaut werden und einen Durchmesser von etwa 25 nm haben. Sie sind relativ dynamische Gebilde, die ständig depolymerisiert und neu geildet werden (dynamische Instabilität). Mikrotubuli spielen in der Zellorganisation eine Stützfunktion

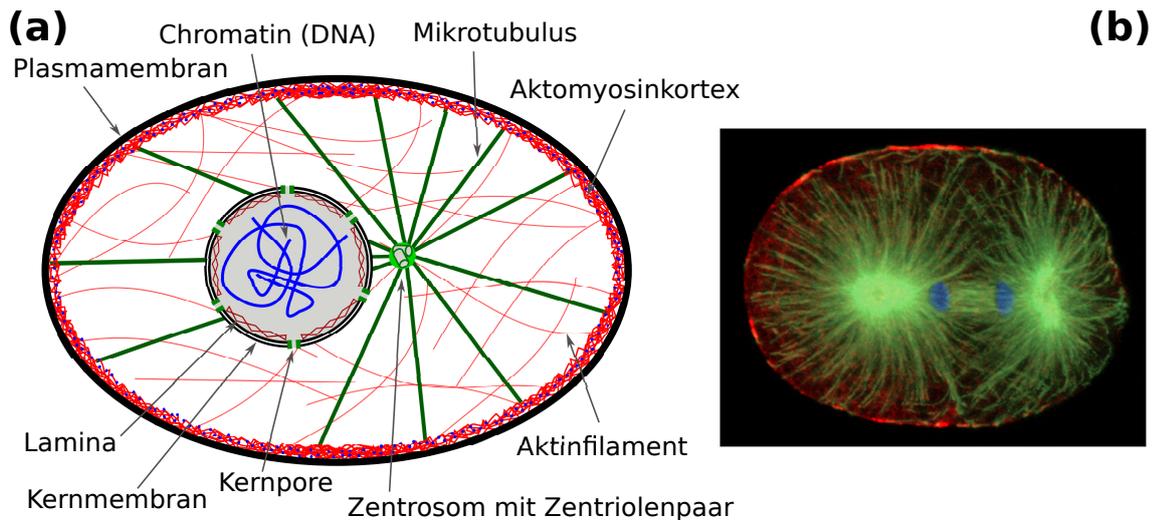


Abbildung 1.2.: Die eukaryotische Zelle. (a) Schematische Zeichnung der für die vorliegende Arbeit wichtigsten Strukturelemente in eukaryotischen Zellen. Die Zellen werden nach außen von der Plasmamembran begrenzt. Das Cytoskelett besteht unter anderem aus dem Aktomyosinkortex sowie den Mikrotubuli. Letztere wiederum sind im Zentrosom organisiert. Der Zellkern wird vom Cytoplasma durch eine Doppelmembran (Kernmembran) und die darunterliegende Lamina abgegrenzt und enthält das Erbgut (DNA). Aktiver oder passiver Transport zwischen Kern- und Cytoplasma ist durch die Kernporen möglich. (b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zygote des *C. elegans*. Die Aufnahme entstand während der ersten Zellteilung (Telophase, siehe Kap. 1.1.2). Markiert sind die Mikrotubuli (grün), die in den beiden Zentrosomen (in den beiden Zentren der sternförmigen Anordnungen) organisiert sind, sowie Myosin (*NMY-2*, rot), ein Bestandteil des Aktomyosinkortex unterhalb der Plasmamembran. Zusätzlich ist die DNA (blau) markiert. Die Länge des Eies beträgt etwa 50 μm . Abbildung von Bruce Bowerman [4].

und sind wichtige Elemente für den gerichteten intrazellulären Transport von z.B. Vesikeln (mit Hilfe von Motorproteinen der Kinesin- und Dynein-Familie) [3]. Weiterhin sind sie gerichtete Strukturen, die über ein Minus- und ein Plus-Ende verfügen. Das Minus-Ende der Mikrotubuli ist typischerweise im sog. Zentrosom verankert. Dieses besteht aus einem Paar nahezu rechtwinklig angeordneter Zentriolen, die in einer Proteinmatrix verankert sind. Während des Zellzyklus verdoppelt sich das Zentrosom, so dass die beiden während der Zellteilung vorhandenen Zentrosomen die mitotische Spindel als deren Pole organisieren können (siehe Kap. 1.1.2 und Abb. 1.2b).

Das Zentrosom befindet sich in der Nähe des Zellkerns. Unter diesem versteht man die meist kugelförmige Zellorganelle, in der sich das Erbgut, die DNA (Desoxyribonukleinsäure¹), befindet [3, 6]. Der Kern wird von der restlichen Zelle, d.h. dem Cytoplasma, durch die Kernmembran abgegrenzt. Diese ist eine Doppelmembran, bestehend aus einer äußeren und inneren Doppellipidschicht (*ONM* und *INM* für *outer/inner nuclear membrane*). An einigen Stellen geht die äußere Kernmembran direkt in das endoplasmatische Retikulum, eine weitere Membranorganelle der Zelle (wichtig für die Proteinsynthese) über. Der Transport zwischen Kern- und Cytoplasma erfolgt durch die Kernporen (*NPC* für *nuclear pore complex*) [7, 8]. Kernporen sind Proteinkomplexe mit achtzähliger Symmetrie. Kleinere Moleküle/Proteine können passiv durch sie hindurchdiffundieren, der Transport größerer Moleküle ist jedoch nur aktiv unter Zuhilfenahme spezieller Transportproteine, z.T. unter Energieverbrauch, möglich. Eine wichtige Proteinklasse für den Import vom Cyto- in das Kernplasma sind die Importine [7].

¹In dieser Arbeit wird generell die englische Abkürzung *DNA* für *deoxyribonucleic acid* anstelle der deutschen Abkürzung *DNS* verwendet.

Unterhalb der INM befindet sich eine weitere Schicht, die sog. Lamina. Ähnlich dem Aktinkortex besteht diese Schicht aus Filamenten, den Laminen. Die Lamina übernimmt eine Stützfunktion für den Kern, hat aber auch Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, auf die Chromatinorganisation und die Zellkerngröße [8–10].

1.1.2. Der Zellzyklus

Für die Entwicklung einer einzelligen Zygote zu einem fortpflanzungsfähigen adulten Lebewesen sind viele Runden der Zellteilung nötig. Der Zellzyklus, also die Abfolge der Stadien während einer Teilungsrunde, lässt sich dabei grob in zwei Phasen einteilen: die *M*-Phase, bei der die Zellteilung selbst stattfindet, und die Interphase, den Zeitraum zwischen zwei Teilungen [11]. Die *M*-Phase kann weiterhin in die Mitose, bei welcher die verdoppelten Chromosomen auf zwei Zellkerne verteilt werden, und die Cytokinese, bei der sich die gesamte Zelle physisch teilt, untergliedert werden. Abb. 1.3 verdeutlicht dies und zeigt die weitere Untergliederung der Mitose (siehe unten).

Nach einer erfolgten Teilung treten die neuen Zellen in die Interphase ein. Diese kann typischerweise in drei weitere Phasen unterteilt werden [3, 11]. Während der anfänglichen *G*₁-Phase können Zellen wachsen und fehlende Komponenten (Cytoplasma, Organellen) ergänzen. Darauf folgt die *S*-Phase, während derer die DNA repliziert wird und sich folglich die Chromosomen verdoppeln. In der anschließenden *G*₂-Phase bereiten sich Zellen auf die nun folgende Mitose vor, gegebenenfalls findet auch erneutes Wachstum statt. Während der frühen Embryogenese des *C. elegans* sind i.A. die *G*₁- und *G*₂-Phase unterdrückt, d.h., der Zellzyklus besteht nur aus *S*- und *M*-Phase [12]. Die ersten Zellen, die über *G*-Phasen verfügen, sind *Ea* und *Ep* im 24-zelligen Zustand [12, 13]. Zudem sind alle Teilungen reine Furchungsteilungen, ein Zellwachstum findet nicht statt. Zellvolumina werden also während der Cytokinese festgelegt und sind danach konstant (siehe Kap. 3.2).

An die Interphase schließt sich die *M*-Phase an. Wie bereits erwähnt wurde, kann die diese in weitere Stadien unterteilt werden (siehe Abb. 1.3 und [3, 11]):

- Während der **Prophase** verdichten sich die bisher dekondensierten Chromosomen zu den kompakten Mitosechromosomen. Diese bestehen aus zwei am sog. Zentromer verbundenen Schwesterchromatiden (DNA-Moleküle, die während der *S*-Phase repliziert wurden). Die Mitosespindel, ein hochgradig dynamisches Gebilde aus Mikrotubuli, beginnt sich zu bilden. Ausgangspunkt hierfür sind die beiden Zentrosomen der Zelle. Die in der Spindel organisierten Mikrotubuli können dabei in drei Gruppen eingeteilt werden. Polare Mikrotubuli beider Spindelhälften überlappen und stabilisieren so die Anordnung. Astrale Mikrotubuli gehen sternförmig von den Zentrosomen aus und verbinden die Spindel mit dem restlichen Cytoskelett bzw. dem Kortex. Sie sind essentiell für die Zentrierung der Spindel [14–16].
- Die dritte Gruppe, die sog. Kinetochormikrotubuli, binden während der nun folgenden **Prometaphase** an die Kinetochore und trennen die Schwesterchromatiden im weiteren Verlauf der Mitose. Als Kinetochor werden die am Zentromer aufsitzenden Proteinkomplexe bezeichnet, welche als Andockstelle für die Mikrotubuli dienen. Da sich die Kinetochore von Schwesterchromatiden auf gegenüberliegenden Seiten des Chromosoms befinden, kann je ein Kinetochor mit einem Zentrosom verbunden werden. Die Zentrosomen befinden sich nun an den Spindelpolen, während die Chromosomen zum Spindeläquator wandern. In höher entwickelten Tieren findet während der Prometaphase die Desintegration der Kernhülle statt (*Nuclear Envelope Breakdown*, NEBD). Diese findet jedoch während der frühen Embryogenese des *C. elegans* zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich der frühen Anaphase statt. Bis dorthin bleibt

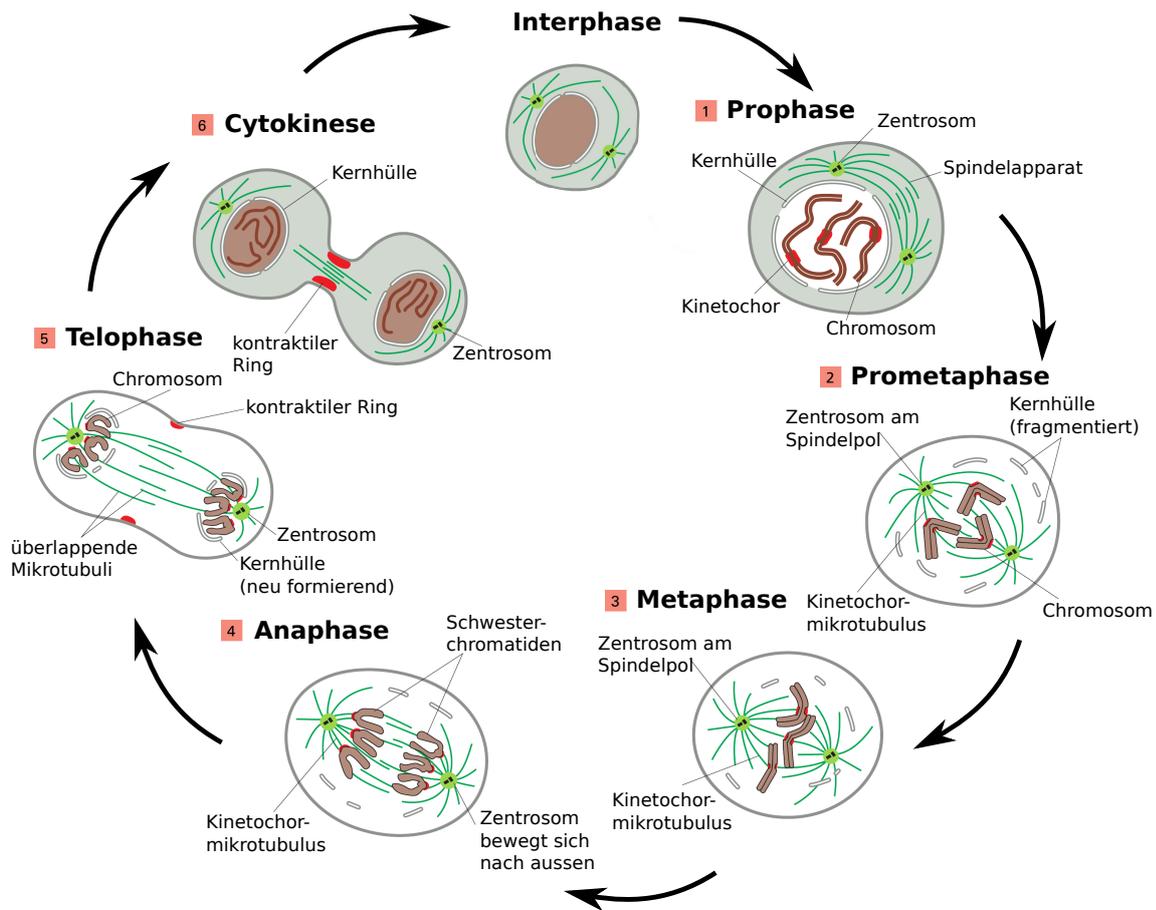


Abbildung 1.3.: Stadien des eukaryotischen Zellzyklus. Der Zellzyklus lässt sich grob in Interphase (bestehend aus G_1 -, S - und G_2 -Phase) und M -Phase unterteilen. Die M -Phase besteht weiterhin aus einer stereotypen Abfolge weiterer Unterphasen. Während der Mitose (Zellkernteilung) sind dies Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase. Die Cytokinese (Zellteilung) schließt die M -Phase ab. Sie kann bereits während der Anaphase der Mitose einsetzen. Nach Abschluss der Cytokinese treten beide neuen Tochterzellen wieder in die Interphase ein, der Zyklus beginnt damit von Neuem. Details siehe Text. Adaptiert von [3].

die Kernhülle intakt und weist nur bei den Polen der Spindel Eintrittsöffnungen für polare und Kinetochormikrotubuli auf [17].

- Während der **Metaphase** ordnen sich die Chromosomen am Spindeläquator im Zentrum der Zelle so an, dass sie in einer Ebene liegen (*Metaphasen-Platte*). Diese Ebene definiert die spätere Ebene der Cytokinese [18], wobei die Information über die Position der Metaphase-Platte sowohl durch astrale Mikrotubuli als auch durch Signale aus der Spindelmitte selbst weitergegeben wird [19]. Während der ersten Zellteilung in *C. elegans* erfolgt während der Metaphase eine exzentrische Verschiebung der Metaphasen-Platte um eine Asymmetrie der Tochterzellvolumina zu erreichen [20] (siehe auch Kap. 3.3).
- Während der **Anaphase A** trennen sich die Zentromere, wodurch die Schwesterchromatiden separiert werden. Diese können somit zu den entgegengesetzten Spindelpolen wandern. In der folgenden **Anaphase B** elongiert die Spindel und die Schwesterchromatiden werden weiterhin voneinander entfernt.

- Schließlich sammeln sich die Chromatiden während der **Telophase** an den Zentrosomen und beginnen zu dekondensieren. Um beide Chromosomengruppen bilden sich neue Kernhüllen.

Die Cytokinese beginnt etwa während der späten Anaphase und endet nach der Telophase. Hierbei werden die beiden neuen Tochterzellen durch die Einschnürung eines kontraktiven Ringes, bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten, auf Höhe der Metaphasen-Platte physisch getrennt. Interessanterweise ist die Dauer der Cytokinese bei frühen Zellteilungen in *C. elegans* unabhängig von der Zellgröße [21].

1.1.3. Das Modellsystem *Caenorhabditis elegans*

Die Nematoden (Fadenwürmer) stellen einen der artenreichsten Stämme des Tierreichs dar. Des Weiteren gehören etwa 80% aller tierischen Individuen diesem Stamm an [22]. *C. elegans* ist ein in den gemäßigten Breiten beheimateter Vertreter der Fadenwürmer. Die Tiere leben im Boden und ernähren sich von Bakterien.

In den 1960er Jahren wurde *C. elegans* von S. Brenner als Modellorganismus für die Zell- und Entwicklungsbiologie sowie für die Genetik vorgeschlagen [23]. Seine ersten Ergebnisse über die Genetik der Art publizierte er 1974 [24], seit dieser Zeit ist *C. elegans* Gegenstand intensiver Forschung. So ist *C. elegans* seit 1998 die erste vielzellige Art, deren Genom vollständig sequenziert wurde [25]. Heute gibt es bereits über 37 000 wissenschaftliche Veröffentlichungen, die diese Art behandeln². Zudem existiert mit dem *WormBook* (www.wormbook.org) eine ständig aktualisierte Sammlung von Review-Artikeln, die sich allen Aspekten der Art sowie deren Handhabung widmet.

Die Gründe für die Beliebtheit als Modellorganismus sind vielfältig. So sind die Tiere optisch transparent und daher lichtmikroskopischen Methoden einfach zugänglich. Die Aufzucht ist unkompliziert und erfordert relativ wenig Aufwand; sie erfolgt auf Agarplatten mit Bakterienrasen als Nahrung (siehe Kap. 2.1). Mittlerweile sind viele stabil transgenierte Wurmlinien mit verschiedensten Mutationen oder Fluorophor-Markierungen käuflich über das *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, [26]) zu erwerben. Ebenso lassen sich Gene einfach mittels RNA-Interferenz ausschalten (Gen-Knockdown durch RNAi), wozu dem Wurm nur genetisch modifizierte Bakterien als Nahrung verabreicht werden müssen. Neben der einfachen Handhabbarkeit im Labor gibt es allerdings auch noch andere, biologische Gründe, die für die Beliebtheit der Art als Modellorganismus verantwortlich sind, wie im Folgenden klar wird.

Allgemeine Merkmale des *C. elegans*

Adulte Würmer haben eine langgestreckte Form. Sie sind circa 1 mm lang und haben einen Durchmesser von etwa 65 µm (siehe Abb. 1.4a). Es treten zwei Geschlechter auf, Hermaphroditen (sie besitzen 2 X-Chromosomen, XX) und Männchen, die nur über ein X-Chromosom verfügen (X0). Hermaphroditen sind in natürlichen Populationen zu etwa 99,9% vertreten. Sie bilden zuerst Spermien und dann Eizellen aus, die sie in ihrer Spermathek selbst befruchten können. Ein sich selbst befruchtender Hermaphrodit legt im Laufe seines Lebens etwa 300 Eier, woraus sich wiederum nahezu nur Hermaphroditen bilden [27]. Alternativ können Männchen Hermaphroditen befruchten, wobei sich der Anteil der männlichen Nachkommenschaft auf etwa 50% bei insgesamt circa 2000 gelegten Eiern erhöht [27].

²Ergebnis einer Stichwortsuche bei ScienceDirect

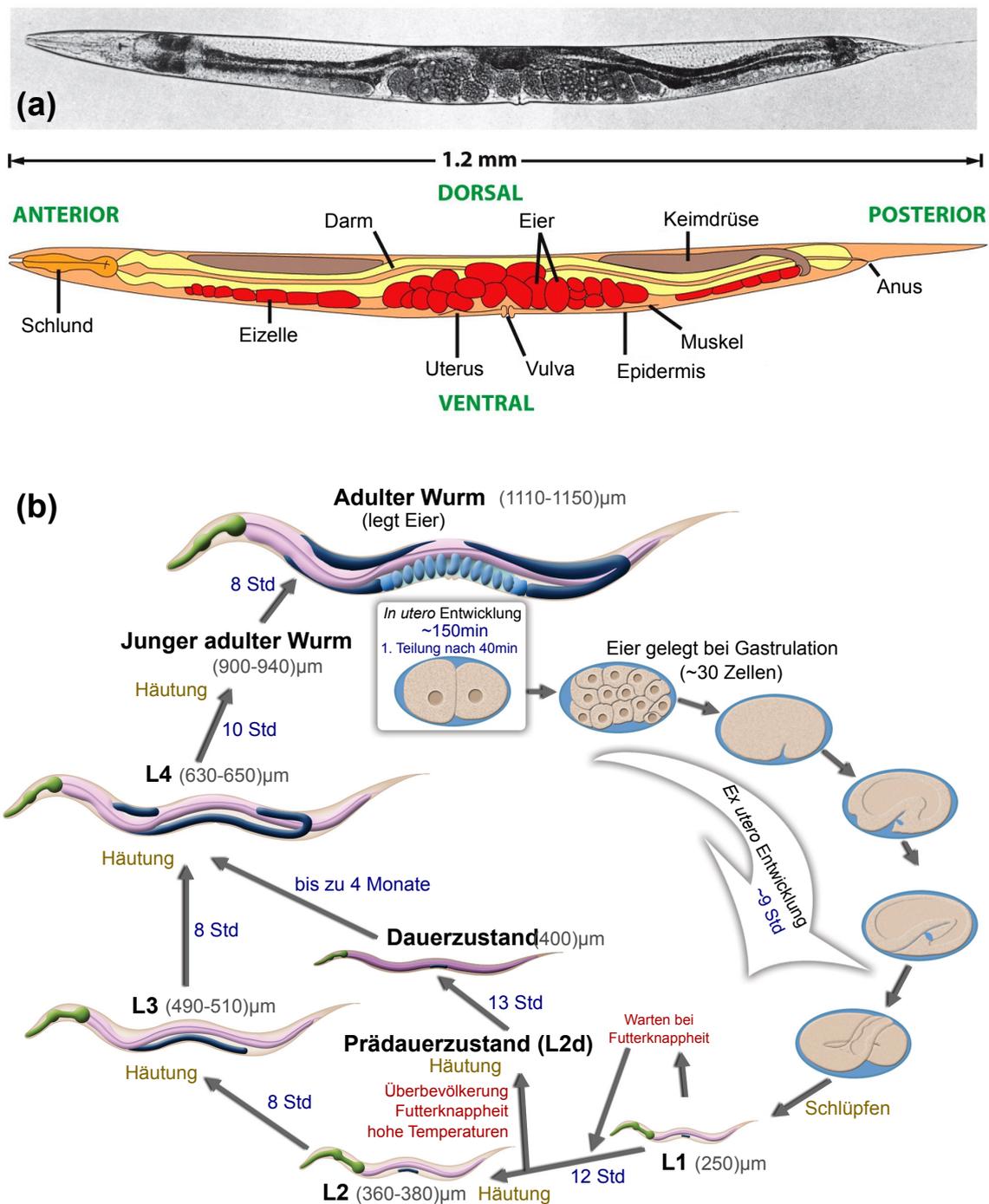


Abbildung 1.4.: *C. elegans* und sein Lebenszyklus. (a) Seitenansicht eines adulten Wurmes. Oben: Hellfeldmikroskopische Aufnahme, unten: schematische Zeichnung des oberen Bildes. Körperachsen und wichtige Organe sind benannt. Abbildungen adaptiert von [13] und [3]. (b) Lebenszyklus des *C. elegans*. Nach der Embryogenese folgen die vier Larvenstadien L1 bis L4, jeweils durch eine Häutung getrennt. Danach tritt der Wurm in das adulte Stadium ein, kann also selbst Nachkommen erzeugen. Bei Stress oder widrigen Bedingungen kann der Wurm alternativ vom Larven- in das Energie sparende Dauerstadium übergehen. Die angegebenen Zeitspannen gelten bei einer Temperatur von 22 °C. Abbildung adaptiert von [28].

Die Entwicklung von der einzelligen befruchteten Zygote hin zum adulten Wurm wird in mehrere Phasen eingeteilt (siehe Abb. 1.4b). Nach der Embryogenese (siehe nächstes Unterkapitel) schlüpft der Embryo und durchläuft während seiner Postembryonalentwicklung insgesamt vier Larvenstadien. Zwischen zwei solchen Stadien findet immer eine Häutung statt. Einen alternativen Entwicklungspfad stellt der sog. Dauerzustand dar. Larven, die Stress durch widrige Umweltbedingungen oder Futterknappheit ausgesetzt sind, treten in diesen passiven Zustand ein und können so mehrere Monate überdauern. Auf die Larvenstadien folgt der adulte Zustand, in dem der Wurm selbst Nachkommen produzieren kann. Die Entwicklungsdauer von der Eizelle bis zum adulten, selbst Eier produzierenden Wurm beträgt bei 20 °C und optimalen Bedingungen etwa (3- 4) Tage. Die Lebenserwartung eines Individuums im Labor (ohne Dauerzustand) ist circa zwei bis drei Wochen.

Das herausragendste Merkmal dieser Art ist die Zellkonstanz (Eutelie). Dies bedeutet, dass jedes adulte Individuum exakt gleich viele somatische Zellen besitzt. Bei Hermaphroditen sind dies 959 (zzgl. etwa 2000 Keimzellen, also Spermien und Oozyten), bei Männchen 1031 (zzgl. ungefähr 1000 Spermien). Mit dem Phänomen der Eutelie eng verbunden ist die Tatsache, dass die Zellgenealogie, also der Abstammungsbaum aller Zellen im adulten Wurm, konstant ist. Das Schicksal einer jeden Zelle zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung, von der Eizelle bis zu den ausdifferenzierten Zellen, ist somit vollständig vorhersagbar. Da damit die Abfolge der Zellteilungen in jedem Individuum gleich ist, können alle Zellen benannt werden. Der Abstammungsbaum aller Zellen ist seit den späten 1970er Jahren bekannt [13, 29–31].

C. elegans mit seinen etwa 1000 somatischen Zellen stellt somit eine Art dar, die über einen sehr einfachen Körperbau verfügt. Zudem ist seine Entwicklung, wie gerade angesprochen, hochgradig reproduzierbar (siehe auch nächstes Unterkapitel). Dennoch besitzt diese Art viele Körperfunktionen, die auch in höher entwickelten Lebewesen von Interesse sind. So verfügt *C. elegans* etwa über Muskeln, einen Verdauungstrakt, Sexualorgane und ein Nervensystem mit einem wegen der Eutelie festen Konnektom, d.h. "Schaltbild" der Nervenzellen [32]. Weitere Eigenschaften, die er mit höheren Lebewesen teilt, sind Alterung [33], Schlaf [34] (ausgelöst von einem einzelnen Neuron) und sogar Ansätze von Lernen und Gedächtnis [35]. Alle diese Eigenschaften können somit anhand von *C. elegans* in stark reduzierter Komplexität, verglichen mit höheren Lebewesen, studiert werden.

Frühe Embryogenese des *C. elegans*

In dieser Arbeit werden Aspekte der frühesten Embryonalentwicklung von *C. elegans* untersucht, daher wird sie an dieser Stelle in Grundzügen beschrieben. Da ausschließlich mit Hermaphroditen gearbeitet wurde, beschränkt sich das Kapitel auf dieses Geschlecht. Unter der Embryogenese versteht man die Entwicklung von der Befruchtung der Eizelle bis zum Schlüpfen des Embryo. Sie lässt sich weiterhin grob in zwei Phasen unterteilen. Bei der anfänglichen Zellproliferation finden schnelle Zellteilungsrunden statt. Am Ende der Proliferation sind bereits alle 558 Zellkerne, die der Wurm beim Schlüpfen besitzt, vorhanden. Durch Zellfusion entstehen sog. Syncytien, d.h. Zellen mit mehreren Kernen, so dass die Zellanzahl niedriger ist [36]. Von diesen 558 Kernen gehören 556 zu somatischen Zellen und zwei zu den Keimbahnzellen Z_1 und Z_2 , aus denen während dem Larvenstadium der Fortpflanzungsapparat gebildet wird [37]. An die Proliferation schließt sich die Morphogenese an, während der sich die Zellanordnung umformt und die Zellen differenzieren, so dass ein überlebensfähiges Individuum entsteht.

Die gesamte Embryogenese findet in einer mehrschichtigen, nicht-permeablen Eihülle statt, die den Embryo von seiner Umwelt abtrennt (Review z.B. in [38]). Die beiden für diese Arbeit wichtigsten Schichten der Eihülle sind die Chitinschicht und die Vitellinschicht

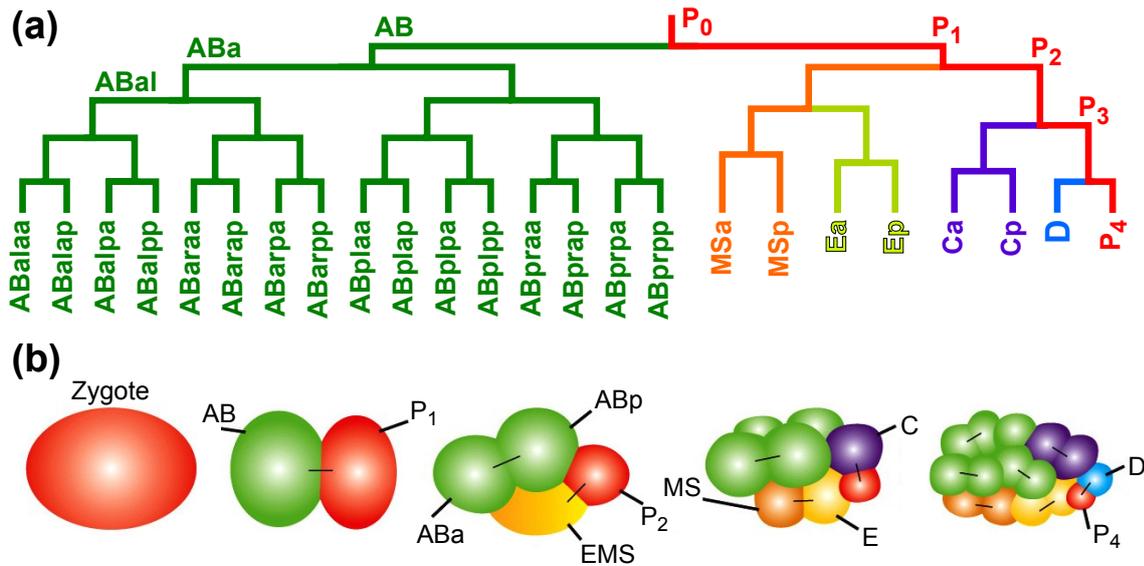


Abbildung 1.5.: Zelllinien und Zellanordnungen bis zur Gastrulation. (a) Abstammungsbaum aller Zellen vor der Gastrulation. Insgesamt gibt es bei der Embryogenese des *C. elegans* sechs sog. Zelllinien, davon sind fünf somatischer Natur (*AB* in grün, *MS* in orange, *E* in gelb, *C* in lila, *D* in blau). Die *P*-Linie (rot) enthält die Vorläufer der Keimbahn. (b) Zellanordnungen während der frühen Embryogenese. In allen Anordnungen ist anterior links, posterior rechts, dorsal oben und ventral unten. Farben wie in (a), dünne Striche markieren Schwesterzellen, also solche, die aus einer Zellteilung hervorgegangen sind. 1. v.l.: Zygote P_0 . Bereits hier wird die AP-Körperachse festgelegt. 2. v.l.: Im zweizelligen Zustand ist *AB* anterior, P_1 posterior. 3. v.l.: Vierzelliger Zustand. Die Zellen ordnen sich in einer Ebene an. Der Kontakt von *ABp* mit P_1 definiert die DV-Achse und legt damit die zweite Körperachse fest. 4. v.l.: Achtzelliger Zustand. Die Gründerzellen *MS*, *E* und *C* liegen vor. 5. v.l.: 24-zelliger Zustand. Nach der Teilung von P_3 in P_4 und *D* liegen alle Gründerzellen und damit Zelllinien vor. Kurz darauf teilen sich die Zellen der *MS*- und *C*-Linie und die Gastrulation beginnt mit der Bewegung von *Ea* und *Ep* in den Innenraum des Embryos. Details siehe Text. Abbildung adaptiert von [3].

bzw. extra-embryonale Matrix (EEM) [38]. Die Chitinhülle wird kurz nach der Befruchtung der Oozyte (unbefruchtete Eizelle) gebildet [39]. Sie ist relativ starr und schützt den Embryo vor (mechanischen) Umwelteinflüssen. Sie kann enzymatisch abgebaut werden (siehe Kap. 2.1). Die innerhalb der Chitinschicht liegende EEM dient als Permeabilitätsbarriere und wahrscheinlich auch zur Unterdrückung der Adhäsion zwischen den Zellmembranen und den äußeren Schichten der Hülle [40].

Da durch die Eihülle das für die Entwicklung zur Verfügung stehende Volumen beschränkt ist und bereits von der Zygote nahezu komplett ausgefüllt wird, findet während der gesamten Embryogenese kein Zellwachstum statt. Mit jeder Zellteilung halbieren die Zellen folglich ungefähr ihr Volumen. Solche Zellteilungen werden allgemein als Furchungsteilungen bezeichnet, die Zellen auch als Blastomere.

Wie bereits dargelegt wurde, verfügt *C. elegans* über eine konstante Zelllinie. Daraus folgt, dass auch während der Embryogenese immer die gleichen Zellen in einem stereotypen Ablauf auftreten (siehe Abb. 1.5a für den Abstammungsbaum der frühesten Embryogenese). Darüber hinaus sind auch die Zeitpunkte, zu dem eine Zelle sich teilt, hochgradig reproduzierbar, ebenso wie die auftretenden Zellanordnungen [41, 42]. Die Entwicklung verlangsamt sich um einen Faktor 1,3 bei einer Reduktion der Temperatur von 20 °C auf 16 °C, bei 25 °C läuft sie um einen Faktor 1,6 schneller ab als bei 20 °C [43] (der Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung wird in Kap. 3 für bestimmte Vorgänge näher untersucht). In folgender Tabelle werden für die Entwicklung wichtige Schritte zusammen-

gefasst und kommentiert. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf 20 °C und wurden anhand eigener Daten gewonnen bzw. aus [44] übernommen.

- 0 min Die Oozyte wird in der Spermathek des Wurmes befruchtet, indem ein Spermium in die Eizelle eintritt. Die Eizelle (nun Zygote genannt) beinhaltet jetzt zwei Zellkerne (einen der Oozyte und einen des Spermiums), die als Pronuklei bezeichnet werden.
- (10 - 25)min Meiose I und II. Hierbei wird überflüssiges Erbgut abgespalten. Die Cytokinese verläuft extrem asymmetrisch. Die beiden dabei entstehenden kleinen Tochterzellen sind die sog. Polkörperchen (siehe z.B. Abb. 1.1, Pfeile). Diese spielen für die weitere Entwicklung keine Rolle.
- (30 - 55)min Polarisierung der Zygote und anschließende Zellteilung (reviewt z.B. in [20, 44]). Zuerst kommt es zu einer Polarisierung, die durch ein advektives Zusammenspiel eines Flusses im Aktomyosinskelett und der sog. PAR-Proteine entsteht (Reaktions-Diffusions-Advektions-System) [45]. Unterteilt wird hier in eine anteriore und eine posteriore Seite, wobei der Eintrittspunkt des Spermiums den posterioren Pol indirekt festlegt (siehe z.B. [20]). Die erste Körperachse wird somit bereits während des ersten Zellzyklus festgelegt. Die beiden Pronuklei bewegen sich währenddessen aufeinander zu und treffen sich in der posterioren Hälfte des Embryo. Als nächstes erfolgt eine Zentrierung der beiden aneinander haftenden Pronuklei, die von einer Rotation begleitet wird. Diese ist dergestalt, dass danach die beiden Zentrosomen auf der anterior-posterioren Achse (AP-Achse) liegen. Die Zygote beginnt nun, sich zu teilen. Während der Metaphase erfolgt zudem eine Verschiebung der Spindel hin zum posterioren Pol, so dass zwei unterschiedlich große Tochterzellen entstehen.
- etwa 55 min Die *M*-Phase der Zygote ist abgeschlossen. Die beiden Tochterzellen sind am anterioren Ende die somatische Zelle *AB* und am posterioren Ende des Embryos die Keimbahnzelle *P*₁ (siehe Abb. 1.5b). Die *AB*-Zelle ist eine der sechs sog. Gründerzellen und begründet die *AB*-Linie (siehe Abb. 1.5a).
- etwa 71 min Symmetrische Zellteilung von *AB*. Die Teilungsachse bildet sich zwar initial orthogonal zur AP-Achse aus, die Eihülle zwingt die Achse allerdings, leicht zu kippen [1, 2], so dass eine Tochterzelle (*ABa*) mehr zum anterioren Pol hin verschoben ist, die andere (*ABp*) mehr zum posterioren.
- etwa 73 min Teilung von *P*₁. Töchter sind die größere Zelle *EMS* und die kleinere *P*₂. Die Teilung ist asymmetrisch; der Mechanismus ist weitgehend identisch mit dem in *P*₀ [20, 46]. Die rautenförmige Zellanordnung innerhalb einer Ebene im nun vorliegenden vierzelligen Zustand (siehe Abb. 1.5b) ist wiederum stereotyp. Hier findet die Festlegung der zweiten Körperachse, der dorsal-ventralen (DV)-Achse statt [47, 48]. Dies geschieht durch Signaltransduktion (*Signalling*) zwischen den Zellen *P*₂ und *ABp*. Mangels Kontakt besteht zwischen *ABa* und *P*₁ keine Möglichkeit der Signaltransduktion.

- etwa 85 min Gleichzeitige Teilung von *ABa* und *ABp*. Während dieser Teilungen wird die letzte Körperachse, die links-rechts (LR)-Achse, festgelegt. Zuerst bilden sich die Teilungsachsen senkrecht zur Ebene der Zellen aus, drehen sich aber während der Mitose um etwa 20°, so dass die jeweils linken Tochterzellen anterior bezüglich ihrer Schwestern liegen [49]. Mit dem Erreichen des sechszelligen Zustandes sind also bereits alle Körperachsen morphologisch festgelegt (Untersuchungen der Cytokinese von *AB* deuten darauf hin, dass die LR-Symmetrie zellintern bereits an dieser Stelle gebrochen ist [50]).
- etwa 90 min Die Teilung der Zelle *EMS* in die beiden Gründerzellen *MS* und *E* erfolgt. Die Teilung wird als (biochemisch) asymmetrisch beschrieben [20].
- etwa 96 min *P*₂ teilt sich. Tochterzellen sind *P*₃ und die Gründerzelle *C*. Ebenso wie die Teilungen von *P*₀ und *P*₁ ist diese asymmetrisch. Die nun vorliegende Anordnung der acht Zellen ist in Abb. 1.5b dargestellt.
- etwa 130 min Die asymmetrische Teilung von *P*₃ in die beiden letzten Gründerzellen *D* und *P*₄ leitet in den 24-zelligen Zustand über (siehe Abb. 1.5b).
- etwa 145 min Im nun vorliegenden (26 - 28)-zelligen Zustand (*MSa* und *MSp* haben sich bereits geteilt, *Ca* und *Cp* befinden sich in der *M*-Phase) beginnt die Gastrulation. Bisher waren alle Zellen (Blastomere) in der sog. Blastula angeordnet, d.h., es befand sich keine Zelle im Inneren des Eies, sondern alle Zellen hatten Kontakt zum Außenraum (Eihülle). Zu Beginn der Gastrulation wandern nun *Ea* und *Ep* (die ersten Zellen mit *G*-Phasen) in den Innenraum des Eies. Dies erfolgt durch eine *apical constriction*, d.h. durch ein Zusammenziehen der außen liegenden Membran, welche eine Ausstülpung in den Innenraum zur Folge hat [51].
- etwa 160 min 44-zelliges Stadium. Die Eiablage ist hier typischerweise bereits erfolgt.
- etwa 12 h Die Embryogenese ist abgeschlossen. Der Wurm hat nun 558 Zellkerne und schlüpft aus der Eihülle, um in das Larvenstadium *L1* einzutreten.

Wie bereits erläutert wurde, sind die Zellanordnungen zu bestimmten Zeitpunkten während der frühen Embryogenese des *C. elegans* stereotyp, treten also in (nahezu) jedem untersuchten Embryo auf die gleiche Weise auf. In der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors konnte gezeigt werden, dass auch die Trajektorien der Zellen, die in die beschriebenen Anordnungen führen, kaum Variation zeigen. Werden die Zellkernpositionen zu korrespondierenden Zeitpunkten in verschiedenen Embryonen miteinander verglichen, so ist die mittlere Positionsabweichung etwa 3,5 µm [1, 2] (zur Robustheit siehe auch [52–54]). Da hierbei auch noch Positionsschwankungen der Zellkerne in den Zellen sowie Messfehler enthalten sind, ist die tatsächliche Positionsabweichung noch kleiner und beträgt nur etwa 5 % der Länge des Embryos.

Schließlich bleibt noch anzumerken, dass die frühesten Stadien der Entwicklung nahezu komplett auf maternal zur Verfügung gestelltes Material aufbauen. Die ersten Anzeichen einer Transkription embryonaler Gene, d.h. der Übersetzung von DNA in RNA, finden sich zwar schon im vierzelligen Zustand. Hier beginnen die somatischen Zellen eigene Gene in RNA zu übersetzen [55] (in der Keimbahn *P*₀ bis *P*₄ bleibt die Transkription durch das Keimbahn-spezifische Protein *PIE-1* gänzlich unterdrückt [56]). Jedoch legen Studien den

Schluss nahe, dass diese neue Übersetzung von Genen in Proteine für die Entwicklung erst später von Belang wird, nämlich nach dem Beginn der Gastrulation im 26-zelligen Zustand. Wird die Transkription gänzlich unterbunden, so entwickelt sich der Embryo dennoch ohne offenkundige Abweichungen vom normalen Verhalten (Zellanordnungen und -teilungszeiten) bis zur Gastrulation [57–59]. Danach treten Abweichungen auf und der Embryo verharrt schließlich ungefähr im 100-zelligen Stadium (siehe auch [60]).

1.1.4. Modellierung der Zellanordnung in *C. elegans*

Während der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors wurde ein einfaches mechanisches Modell entwickelt, mit dem die Zellanordnung während der frühesten Embryogenese, d.h. von der Zygote bis zum 12-zelligen Zustand, erklärt werden kann. Da dieses Modell für die vorliegende Arbeit grundlegend ist, wird es an dieser Stelle rekapituliert. Für eine eingehendere Diskussion sei auf die Diplomarbeit verwiesen [1]. Zudem wurde besagtes Modell 2013 in einem Artikel im *Biophysical Journal* veröffentlicht und ausgiebig diskutiert [2].

K. Yamamoto und A. Kimura (National Institute of Genetics, Mishima, Japan) verwendeten und modifizierten dieses Modell, um die Stabilität der Zellanordnung bis zum vierzelligen Zustand bezüglich Änderungen der Eiform zu untersuchen [61]. Da dies sehr stark mit dem übergeordneten Thema dieser Arbeit, der Stabilität der Embryogenese, korreliert, wird auch darauf im Folgenden kurz eingegangen.

Modellierung der Zellanordnung - Stand 2013

Wie bereits erwähnt wurde, erscheint die Zellbewegung während der frühen Embryogenese wie ein deterministischer Prozess. Dies legt den Schluss nahe, dass die Ursache der Zellbewegung einfachen, mechanischen Gesetzmäßigkeiten genügt.

Dem während der Diplomarbeit entwickelten Modell liegt daher die Annahme zugrunde, dass die Zellen als elastische Objekte beschrieben werden können, die bevorzugt eine sphärische Form annehmen. Werden Zellen deformiert, etwa durch benachbarte Zellen oder die den Embryo einschließende Eihülle, so entstehen folglich repulsive Kräfte, die der Ursache der Deformation entgegenwirken (siehe Abb. 1.6a). Die Rechtfertigung für die Annahme präferentiell sphärischer Zellen ist die Tatsache, dass Zellen eine runde Form annehmen, wenn die Eihülle komplett entfernt wird [62].

In dem Modell werden folglich Zustände mit n Zellen durch eine miteinander wechselwirkende Anordnung von n Kugeln der Radien R_i ($i = 1, \dots, n$, zur Bestimmung der Zellradien siehe unten) beschrieben. Die Schwerpunkte der Kugeln seien \mathbf{r}_i . Jede Zelle/Kugel interagiert in diesem Modell potentiell mit jeder anderen (Kräfte \mathbf{F}_C) sowie mit der Eihülle (Kraft \mathbf{F}_W), siehe hierzu Abb. 1.6b. Zusätzlich treten in biologischen Systemen immer auch Fluktuationen auf, die z.B. thermisch getrieben sein können. In dem betrachteten Fall können auch stochastische Bewegungen des Cytoskeletts, der Zellmembran usw. die Zellanordnung beeinflussen. Aus diesem Grund ist der Kraft-getriebenen, deterministischen Zellbewegung ein Rauschterm ξ überlagert (ξ ist unkorreliert, hat den Mittelwert Null und die Varianz σ_ξ^2 , siehe unten). Da die Zellen dicht in der Eihülle liegen und die auftretenden Geschwindigkeiten klein sind, können Beschleunigungsterme vernachlässigt werden.

Insgesamt wird damit die Anordnung von n Zellen durch n gekoppelte überdämpfte Langevin-Gleichungen beschrieben. Da diese nicht analytisch lösbar sind, wird die Lösung

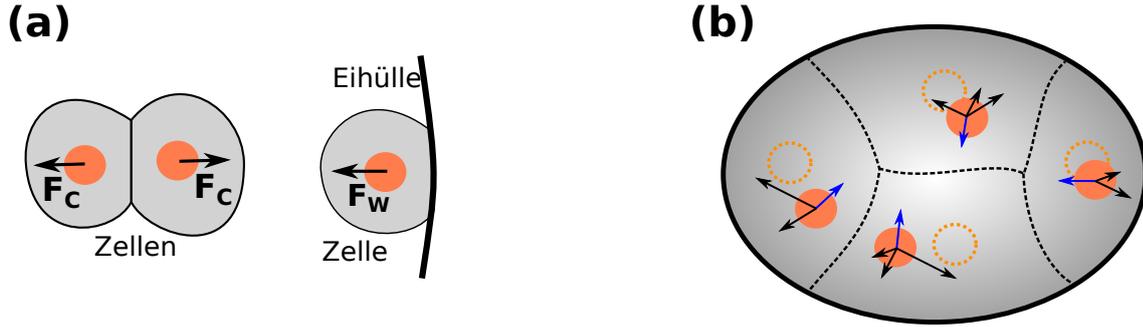


Abbildung 1.6.: Modellierung der Zellbewegung während der frühen Embryogenese. (a) Die Zellen werden in dem Modell als elastische Objekte beschrieben, die bevorzugt eine Kugelgestalt annehmen. Daraus resultierend ergeben sich abstoßende Kräfte als Folge von Verformungen, die entweder durch Zellkontakte (links) oder durch Kontakt mit der Eihülle (rechts) entstehen können. (b) Im Modell füllen die Zellen die Eihülle vollständig aus. Daher wechselwirkt jede Zelle mit all ihren Nachbarn (schwarze Pfeile) sowie mit der Eihülle (blaue Pfeile). Die Kräfte greifen am aktuellen Ort der Zelle \mathbf{r} (orange Kreise, entspricht dem Zellkern) an und führen so zur Migration der Zellen, hin zu Gleichgewichtspositionen (orange gestrichelte Kreise). Die tatsächlichen Zellformen (schwarz gestrichelt) werden im Modell nicht bestimmt. Abbildung gemäß [63].

numerisch mittels einer in Matlab implementierten Simulation berechnet. Die diskretisierte Form der Bewegungsgleichung für die Zelle i ist

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{\Delta t}{\gamma} \left(\mathbf{F}_W(\mathbf{r}_i(t)) + \sum_{j \neq i} \mathbf{F}_c(\mathbf{r}_i(t), \mathbf{r}_j(t)) \right) + \boldsymbol{\xi}. \quad (1.1)$$

Hierbei ist \mathbf{r}_i der Ort des Zell-/Kugelschwerpunktes, Δt das zeitliche Integrationsintervall und γ die Dämpfung. Die Summation läuft über alle anderen Zellen $j \neq i$.

Über die Gestalt der Kräfte ist erst einmal nichts bekannt. Daher wurden sie als isotrop und linear vom Abstand der Zellen zur Eihülle bzw. zueinander abhängig angenommen (mit Ausnahme sehr kurzer Distanzen, siehe unten). Die Rechtfertigung für die Annahme isotroper und linearer Kraftgesetze ist zum einen, dass dies mit Sicherheit der einfachste Ansatz ist und wenige Parameter zur Beschreibung genügen. Außerdem nehmen Zellen innerhalb des Embryos häufig Formen an, die an eine Anordnung elastischer Bälle oder eines Schaumes in der vorgegebenen Geometrie der Eihülle erinnern (siehe z.B. [62]).

Um die Kraft von der Eihülle auf die Zelle i zu berechnen wird die Annahme gemacht, dass die Kraft entlang des kürzesten Abstandes \mathbf{a}_i von der Eihülle zu \mathbf{r}_i wirkt (auf eine Integration über die gesamte potentielle Kontaktfläche zur Eihülle wird also verzichtet). Für die Kraft wird in der Simulation

$$\mathbf{F}_W(\mathbf{r}_i) = \begin{cases} F_{W,0} \left(1 - \frac{a_i}{R_i} \right) \mathbf{e}_i & \text{für } a_i \leq R_i \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (1.2)$$

gesetzt. Hierbei ist $\mathbf{e}_i = \mathbf{a}_i / |\mathbf{a}_i|$ der Einheitsvektor, der von der Eihülle zum Zellschwerpunkt, also in Krafrichtung, zeigt. $F_{W,0}$ gibt die Stärke der Wechselwirkung an (für eine Diskussion der Parameter siehe unten und Tabelle 1.2). Die Kraft, die von der Eihülle auf die Zelle ausgeübt wird, ist folglich Null, wenn die Zelle keinen Kontakt zur Eihülle hat. Ab dem Moment, ab welchem die Zelle die Hülle berührt ($a_i = R_i$), verformt sich die Zelle und erfährt somit eine Kraft. Diese wird umso größer, je näher \mathbf{r}_i an die Hülle rückt. Der Abstand \mathbf{a}_i der Zelle von der Eihülle wird in der Simulation numerisch berechnet. Hierzu werden auf der ellipsoiden Hülle Punkte im Abstand von 15 nm platziert.

Für alle diese Punkte wird der Abstand zu \mathbf{r}_i berechnet und derjenige Punkt \mathbf{p} mit dem geringsten Abstand verwendet. Damit ergibt sich $\mathbf{a}_i = \mathbf{r}_i - \mathbf{p}$. Die Eihülle selbst wird als Rotationsellipsoid der Abmessungen $L_{AP} \times L_{DV} \times L_{LR}$ modelliert.

Die Kraft, die die Zelle j am Ort \mathbf{r}_j auf Zelle i am Ort \mathbf{r}_i ausübt, wirkt entlang der Verbindungslinie der Zellschwerpunkte, $\mathbf{d}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$. Als funktionale Form wird in der Simulation

$$\mathbf{F}_C(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) = F_{C,0} \mathbf{e}_{ij} \begin{cases} 1 & \text{für } d_{ij} < \min(R_i, R_j) \\ \frac{R_i + R_j - d_{ij}}{\max(R_i, R_j)} & \text{für } \min(R_i, R_j) \leq d_{ij} \leq R_i + R_j \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (1.3)$$

verwendet. Hier ist $d_{ij} = |\mathbf{d}_{ij}|$ der Abstand der Zellschwerpunkte und $\mathbf{e}_{ij} = \mathbf{d}_{ij}/|\mathbf{d}_{ij}|$ die Richtung der Kraft. $F_{C,0}$ gibt die Stärke der Wechselwirkung an. Wie bei \mathbf{F}_W gilt auch hier, dass die Zellen keine Kraft aufeinander ausüben, wenn sie sich nicht berühren ($d_{ij} > R_i + R_j$). Sobald sie sich nahe genug kommen, treten sie in Wechselwirkung. Bei kleinen Abständen, die vor allem kurz nach Zellteilungen auftreten (siehe unten), wird die Kraft als konstant angenommen. Dies ist heuristisch und soll zu große Geschwindigkeiten direkt nach erfolgter Zellteilung vermeiden.

Wie bereits ersichtlich wurde, werden in dem Modell nur die Zellbewegungen bei einer konstanten Zellanzahl n betrachtet. Zellteilungen können damit nicht erklärt werden, sondern müssen extern parametrisch vorgegeben werden. Für jede einzelne Zellteilung muss folglich die Teilungsachse, der Zeitpunkt sowie die volumetrische Asymmetrie der Teilung (für die Berechnung der Zellradien) vorgegeben werden. In der Simulation wird bei jedem Zeitschritt anhand der vorgegebenen Teilungszeiten geprüft, ob eine Teilung stattfindet. Falls dem so ist, wird die sich teilende Zelle i durch zwei neue Zellen $T1$ und $T2$ entlang der vorgegebenen Teilungsachse \mathbf{d} ersetzt gemäß $\mathbf{r}_{T1/T2} = \mathbf{r}_i \pm 100 \text{ nm} \cdot \mathbf{d}$. Die Gesamtzahl der Zellen wird dabei folglich um eins erhöht, danach können die Zellpositionen wie oben beschrieben weiter iteriert werden. Während eines Zeitschrittes können natürlich auch mehrere Zellteilungen auftreten.

Die Achsen und Zeitpunkte der Teilungen konnten während der Diplomarbeit aus den mit dem Lichtblattnmikroskop aufgenommenen Bildern extrahiert werden. Die Bestimmung der Teilungsasymmetrie bedingt eine Bestimmung der Tochterzellvolumina, was zum damaligen Zeitpunkt noch nicht möglich war. Daher wurden die Teilungsverhältnisse geschätzt. Für alle somatischen Zellteilungen, die in der Simulation behandelt wurden, wurde eine symmetrische Teilung angenommen, d.h., den beiden entstehenden Tochterzellen wird dasselbe Volumen $V_T = V_M/2$ zugewiesen (mit dem Volumen V_M der Mutterzelle). Die Radien folgen daher zu $R_T = R_M/2^{1/3}$. Für alle Teilungen der Keimbahnzellen wurde das Verhältnis der Tochterzellvolumina auf 3:2 geschätzt, dass also das Volumen der neuen somatischen Tochterzelle 1,5 mal so groß ist wie das der neuen P -Zelle. Der Radius der neuen somatischen Zelle in diesem Fall ist $R_{T1} = (3/5)^{1/3} R_M$, der der neuen P -Zelle $R_{T2} = (2/5)^{1/3} R_M$. Bei gegebenem Volumen/Radius der Zygote können mit dem beschriebenen Vorgehen die Radien aller folgenden Zellen berechnet werden. Das Volumen der Zygote P_0 wurde so gewählt, dass die Eihülle komplett ausgefüllt ist, also $R_{P_0} = (L_{AP} L_{DV} L_{LR})^{1/3}$ (Parameter siehe Tab. 1.2).

Mit dem beschriebenen Modell konnten die Zellanordnungen bis zum Ende des 12-zelligen Zustandes simuliert werden. Zustände nach dem 12-zelligen waren seinerzeit nicht zugänglich, da die nötigen Teilungsachsen aus den Bildaufnahmen nicht stabil ausgelesen werden konnten. Um die Ergebnisse mit den tatsächlichen Anordnungen vergleichen zu können, wurden die Positionen der Zellkerne aus dreidimensionalen lichtblattnmikroskopischen Aufnahmen ausgelesen (*Tracking*). Da sich die Zellkerne im Zentrum der Zelle

Parameter	Wert
Zell-Zell-Wechselwirkung $F_{C,0}/\gamma$	0,1 $\mu\text{m}/\text{s}$
Zell-Eihülle- Wechselwirkung $F_{W,0}/\gamma$	0,2 $\mu\text{m}/\text{s}$
Zeitschritt Δt	5 s
Eigröße $L_{AP} \times L_{DV} \times L_{LR}$	$(50 \times 30 \times 30)\mu\text{m}^3$
Varianz des Rauschens σ_{ξ}^2	0,027 μm^2

Tabelle 1.2.: Simulationsparameter. Angegeben sind die Parameter, die in der Diplomarbeit des Autors [1] sowie in der Veröffentlichung [2] verwendet wurden. Zur Bedeutung der Parameter siehe Text.

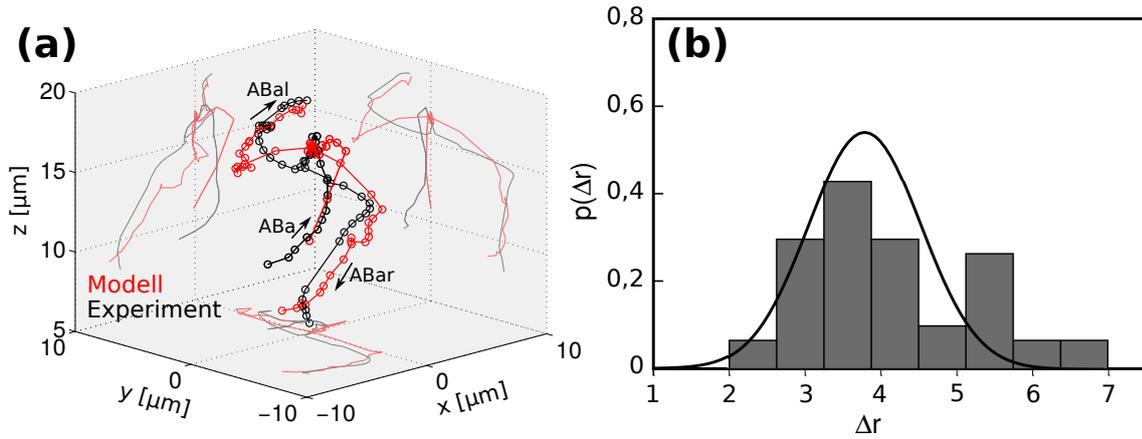


Abbildung 1.7.: Ergebnisse der Modellierung der Zellbewegung. (a) Repräsentatives Beispiel simulierter (rot) und experimentell mittels Tracking bestimmter Zelltrajektorien (schwarz). Gezeigt sind die Trajektorien der Zelle *ABa* sowie ihrer beiden Tochterzellen *ABal* und *ABar*. Pfeile geben die Bewegungsrichtung an. Punkte entlang der Trajektorien haben einen Abstand von 60s (dazwischen lineare Interpolation). Man erkennt leicht die gute Übereinstimmung. Zur besseren Sichtbarmachung wurden Projektionen der Trajektorien auf die Koordinatenebenen mit eingezeichnet. Abbildung aus [1]. (b) Die Häufigkeitsverteilung $p(\Delta r)$ der Positionsabweichungen Δr zwischen simulierten und gemessenen Trajektorien (graue Balken) liegt in guter Übereinstimmung mit der experimentell bestimmten Variation der Zellpositionen in verschiedenen Embryonen (schwarze Linie). Folglich kann das Modell Zellanordnungen innerhalb der experimentellen Genauigkeit vorhersagen. Siehe hierzu auch [1, 2]. Abbildung aus [2].

befinden [64], sollten deren Positionen etwa den simulierten Zellschwerpunkten r_i entsprechen. Die noch zu bestimmenden freien Parameter $F_{W,0}/\gamma$ und $F_{C,0}/\gamma$ (vgl. Gl. 1.1) wurden nun so festgelegt, dass die simulierten mit den experimentellen Zelltrajektorien am besten übereinstimmen. Dabei hat sich die Wahl beider Parameter als relativ unkritisch herausgestellt. Eine Erhöhung oder Erniedrigung beider Parameter um den gleichen Faktor ändert die erhaltenen Zellanordnungen nicht, sondern ändert nur die Geschwindigkeit der Zellbewegung. Auch bei einer Veränderung des Verhältnisses $F_{W,0}/F_{C,0}$ ändert sich die simulierte Zellanordnung nicht qualitativ, die Zellen werden lediglich mehr oder weniger stark in Richtung Zentrum der Eihülle komprimiert. Die Varianz des Rauschterms ξ wurde so gewählt, dass Zellen instabile Gleichgewichtspositionen schnell verlassen können, die simulierten Trajektorien allerdings nicht zu stark beeinflusst werden. Die Größe der ellipsoiden Eihülle kann ebenfalls frei gewählt werden. Hierfür wurde die mittlere Größe realer Embryonen verwendet. Die letztendlich verwendeten Werte finden sich in Tabelle 1.2.

In Abb. 1.7a sind getrackten Zelltrajektorien ihre entsprechenden simulierten gegenübergestellt. Wie man erkennt, stimmen sie gut überein. Tatsächlich ist die mittlere Abweichung der simulierten Zellpositionen von den experimentell ermittelten von der gleichen Größenordnung wie die experimentell ermittelte Schwankung, also die Positionsvariabilität der Zellen in verschiedenen Embryonen (Abb. 1.7b), nämlich etwa $3,5 \mu\text{m}$. Damit lässt sich festhalten, dass die experimentell beobachteten Zellanordnungen durch das Modell erstaunlich genau wiedergegeben werden können. Dies ist in Anbetracht der Einfachheit des Ansatzes bemerkenswert. Immerhin werden nahezu jegliche Kontinuumsaspekte vernachlässigt und das Problem der Zellmigration effektiv auf ein punktmechanisches Problem reduziert (die Ausdehnung der Zellen geht nur in die Reichweite der Kräfte ein). Aufgrund der guten Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Beobachtungen kann damit gesagt werden, dass die Zellanordnung während der frühen Embryogenese des *C. elegans* ein von Zellteilungen getriebener Relaxationsprozess ist.

Anhand des Modells können einige experimentelle Beobachtungen erklärt werden. So sind z.B. die Zellen im vierzelligen Zustand in einer rautenförmigen Konfiguration angeordnet. Dabei liegen alle Zellkerne in einer Ebene. Dies wird von der Simulation mit hoher Genauigkeit reproduziert. Der Grund für diese zweidimensionale Konfiguration ist, dass (bei der vorgegebenen Eigeometrie) in dieser Anordnung die Abstände der Zellen maximal und daher die Kräfte minimal werden. Zusätzlich können die Parameter der Zellteilungen variiert und die Folgen untersucht werden. So ergibt sich, dass die finalen Zellpositionen kritisch auf größere Änderungen der Teilungsachsen reagieren. Die Zellpositionen zum Ende des 12-zelligen Zustandes sind hingegen deutlich weniger stark anfällig für Variationen der Zellteilungszeitpunkte. In Kap. 3.6 wird jedoch gezeigt, dass diese Aussage nur eingeschränkt gilt. Wird der Beobachtungszeitraum auf Zustände mit mehr als 12 Zellen erweitert, so zeigen sich auch hier signifikante Abweichungen, wenn die Teilungszeiten geändert werden.

Ein großes Problem des Modells ist, dass Zellteilungen nicht enthalten sind und parametrisch behandelt werden müssen. Für jede Zellteilung müssen drei Parameter vordefiniert übergeben werden. Soll also die Zellanordnung von der Zygote bis zum n -zelligen Zustand simuliert werden, müssen $3(n - 1)$ Parameter festgelegt werden. Um das Modell eigenständiger und weniger abhängig von Parametern zu machen, ist es daher wünschenswert, Zellteilungen mitzusimulieren. Im Laufe dieser Arbeit ist dies für die Asymmetrie und die Zeitpunkte der Teilungen gelungen, was in Kap. 3.6 ausführlich behandelt wird. Die Teilungsachsen müssen allerdings immer noch parametrisch übergeben werden.

Robustheit bezüglich der Eiform - attraktive Potentiale

Auf dem soeben besprochenen Modell baut eine Studie von K. Yamamoto und A. Kimura (National Institute of Genetics, Mishima, Japan) auf. Hier sollen die relevanten Ergebnisse kurz und ohne Anspruch auf Vollständigkeit zusammengefasst werden, für eine eingehendere Diskussion wird auf deren Veröffentlichung verwiesen [61].

Grundlegende Beobachtung war, dass die Zellanordnungen im vierzelligen Zustand im Stamm der Nematoden zwar divers, aber innerhalb einer Art wiederholgenau sind [65, 66]. Im Wesentlichen treten hier bei allen untersuchten Arten vier mögliche Anordnungen auf: rautenförmige (wie auch bei ungestörten *C. elegans*-Embryonen), T-förmige, pyramidenförmige und lineare Anordnungen (siehe Abb. 1.8a). Die Ausrichtung der mitotischen Spindeln spielt hier sicher eine wichtige Rolle, kann die Anordnungen alleine aber nicht erklären: die Zellen bewegen sich nach erfolgter Teilung, außerdem ist die Anordnung eine andere, wenn die Eihülle entfernt wird [58]. Der Eihülle kommt hier also ebenso Bedeutung zu. Da sich die Form der Eihülle bei verschiedenen Arten unterscheidet [66], mutmaßen

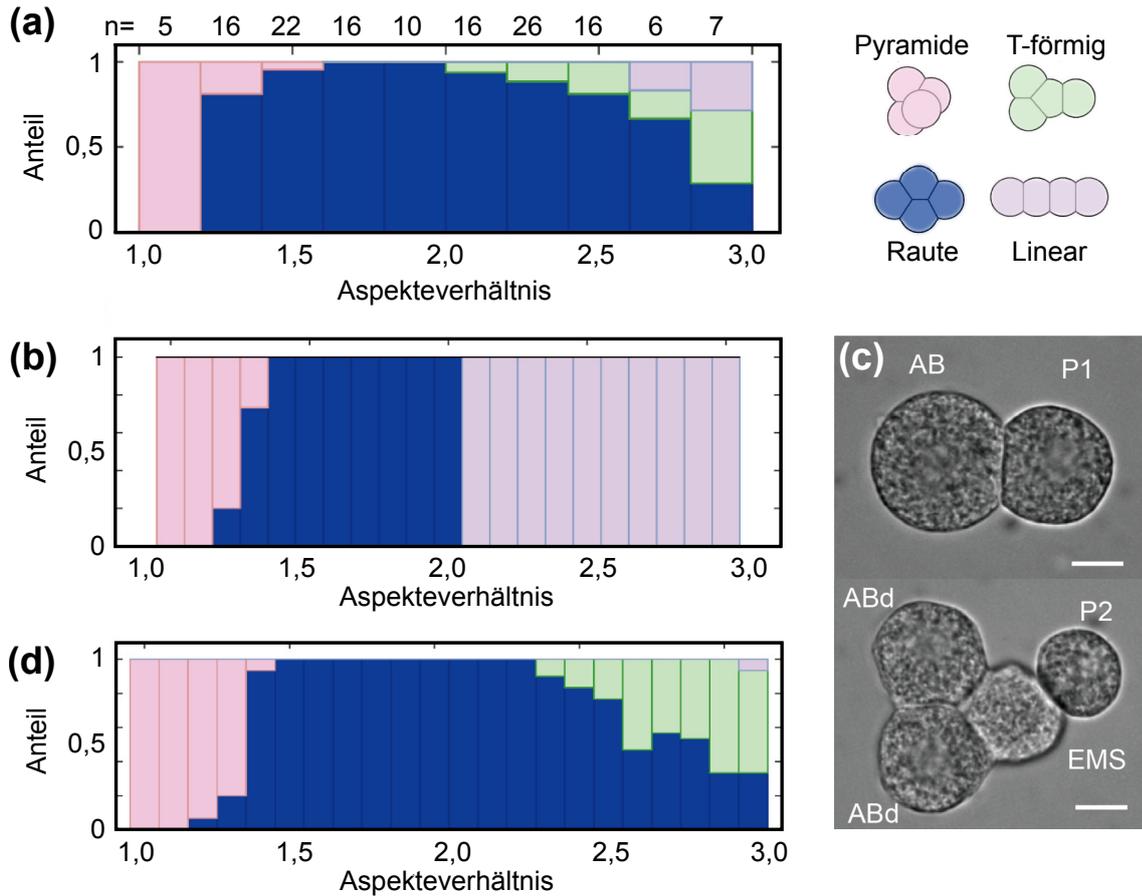


Abbildung 1.8.: Weiterentwicklung des Modells durch Yamamoto und Kimura. (a) Das Aspekteverhältnis der Eihülle in *C. elegans*, $AR = L_{AP}/L_{DV}$, wurde experimentell verändert (RNAi). Die sich ergebenden Aspekteverhältnisse lagen zwischen 1,0 und 3,0. Bei kleinen AR herrscht am Ende des vierzelligen Zustandes eine pyramidenförmige Anordnung der Zellen vor (rosa). Zwischen $1,3 < AR < 2,8$ ist hingegen der rautenförmige Zustand dominant (blau), so auch in ungestörten Embryonen ($AR \approx 1,6$). Bei größeren AR treten auch immer größer werdende Fraktionen einer T-förmigen (grün) und linearen (lila) Anordnung auf. Links: Schematische Zeichnungen der möglichen Zellanordnungen (Farbe wie beschrieben). (b) Mit dem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Modell können die Anordnungen bei großen AR nicht reproduziert werden (Farben wie in (a)). (c) Selbst bei entfernter Eihülle haben die Zellen einen Abstand, der kleiner als die Summe ihrer Radien ist. Folglich treten attraktive Wechselwirkungen (Adhäsion) auf. Der Grad der Adhäsion hängt von den Zellen ab. Während die Zellen der AB -Linie und EMS relativ stark gebunden sind, wechselwirkt P_2 nur schwach mit EMS . Längenskala $10 \mu\text{m}$. (d) Wird die Zell-Zell-Wechselwirkung (Gl. 1.3) um einen attraktiven Anteil bei großen Zellabständen ergänzt (Gl. 1.4), so können die experimentell beobachteten Zellanordnungen mit dem Modell gut reproduziert werden (Farben wie in (a)). Alle Abbildungen aus [61].

Yamamoto und Kimura, dass hiermit die Art-spezifisch unterschiedlichen, aber wiederholgenauen Anordnungen erklärbar sind.

Um diese Hypothese zu testen wurde das Aspekteverhältnis AR der Eihülle von *C. elegans*-Embryonen, also das Verhältnis der langen zur kurzen Achse der Hülle, genetisch verändert. Dies ist durch das Ausschalten bestimmter Gene, welche die embryonale Größe beeinflussen, mittels RNAi (siehe Kap. 2.1) möglich. Insgesamt wurden die Zellanordnungen in 188 Embryonen mit einem Aspekteverhältnis zwischen 1,0 (kugelförmig) und 3,0 (elongiertes Ei) untersucht. Dabei ergab sich, dass die Zellen in Eiern mit kleinem AR meist in einer pyramidenförmigen Konfiguration vorliegen. Bei mittleren AR herrscht die auch im ungestörten Embryo ($AR \approx 1,6$) auftretende rautenförmige Anordnung vor. Bei

AR -Werten, die jene von ungestörten Embryonen übersteigen nehmen die Anteile der T-förmigen und der linearen Anordnung zu (siehe Abb. 1.8a). Die einzigen überlebensfähigen Embryonen waren dabei solche mit einer rautenförmigen Anordnung.

In einem zweiten Schritt testeten Yamamoto und Kimura, ob diese Ergebnisse mit der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Simulation reproduziert werden können. Der Quellcode wurde ihnen dafür vom Autor dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Da in der Simulation das Aspektverhältnis über die frei wählbaren Parameter L_{AP} , L_{DV} und L_{LR} leicht geändert werden kann, sind hierzu keine Änderungen am Programm nötig. Die damit erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 1.8b dargestellt. Man erkennt, dass die rautenförmige Anordnung ungestörter Embryonen korrekt wiedergegeben wird, ebenso wie der Übergang zur pyramidenförmigen Konfiguration bei kleinen AR . Bei $AR > 2$ findet allerdings in den simulierten Anordnungen ein scharfer Übergang zur linearen Anordnung statt, der so in den *in vivo* Daten nicht enthalten ist (dort zeichnet sich die rautenförmige Anordnung durch eine höhere Robustheit bzgl. Änderungen der Eiform aus). Die T-förmige Anordnung fehlt in den simulierten Daten völlig. Änderungen der Parameter $F_{W,0}$ oder $F_{C,0}$ hatten nahezu keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Das Modell reicht somit in seiner ursprünglichen Form nicht aus, um Zellanordnungen bei vom ungestörten Fall stark abweichenden AR zu erklären.

Der Grund dafür, dass das Modell bei $AR > 2$ kollabiert, ist, dass Adhäsionskräfte vollständig vernachlässigt werden. Nach dem Modell würden sich Zellen der Radien R_i und R_j bei fehlender Eihülle so lange voneinander entfernen, bis für ihren Abstand $d_{ij} = R_i + R_j$ gilt. Dies ist in der Realität nicht der Fall, wie in Abb. 1.8c gezeigt ist. Aufgrund der Adhäsion stellt sich ein Abstand $d_{ij} = \alpha(R_i + R_j)$ ein mit $\alpha < 1$. Bei $d_{ij} > \alpha(R_i + R_j)$ treten somit *attraktive* Wechselwirkungen zwischen den Zellen auf, die im bisherigen Modell komplett fehlen. Des Weiteren hängt der Wert α von den Zellen ab. So sind die Zellen der AB -Linie und EMS im vierzelligen Zustand ohne Eihülle relativ stark miteinander verbunden, während P_2 nur schwach an EMS gebunden ist (siehe Abb. 1.8c). Aus Messungen der Gleichgewichtsabstände und Radien ohne Eihülle konnten Yamamoto und Kimura zeigen, dass $\alpha \approx 0,75$ für alle somatischen Zellkontakte und $\alpha \approx 0,9$ für den Kontakt von EMS und P_2 gilt.

Um diesen Effekt im Modell aufzunehmen, wurde die Definition der Zell-Zell-Wechselwirkung (Gl. 1.3) abgeändert zu

$$F_C(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) = F_{C,0} \mathbf{e}_{ij} \begin{cases} 1 & \text{für } d_{ij} < \min(R_i, R_j) \\ \frac{R_i + R_j - d_{ij}}{(R_i + R_j) - \min(R_i, R_j)} & \text{für } \min(R_i, R_j) \leq d_{ij} < 0,5(1 + \alpha)(R_i + R_j) \\ 1 + \frac{\min(R_i, R_j) - d_{ij}}{(R_i + R_j) - \min(R_i, R_j)} & \text{für } 0,5(1 + \alpha)(R_i + R_j) \leq d_{ij} \leq (R_i + R_j) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (1.4)$$

mit den Definitionen von oben. Die Kraft wurde also um einen attraktiven Anteil bei $d_{ij} \lesssim (R_i + R_j)$ ergänzt. Der Parameter α hängt von den betreffenden Zellen i und j ab, die verwendeten Werte sind die oben genannten Messwerte. Erstaunlicherweise werden die experimentell beobachteten Anordnungen im vierzelligen Zustand durch diese kleine Änderung des Modells recht präzise reproduziert (siehe Abb. 1.8d). Die rautenförmige Anordnung bleibt nun auch für $AR > 2$ dominant. Zudem tritt der T-förmige Zustand bei hohen AR neben dem rautenförmigen und dem linearen auf, wie dies auch *in vivo* der Fall ist.

Des Weiteren konnten die Autoren experimentell zeigen, dass der rautenförmige Zustand bei hohen AR tatsächlich, wie dies vom ursprünglichen Modell vorhergesagt wird, instabil ist, wenn die Zelladhäsion verringert wird. Hierzu schalteten sie mittels RNAi die Funktio-

nalität von E-Cadherin und β -Catenin aus (*hmr-1*, *hmp-2* RNAi). Sobald $AR > 2$, zeigte nur noch eine Minderheit der untersuchten Embryonen eine rautenförmige Zellanordnung. Jedoch nahm der Rest nicht wie vorhergesagt eine lineare Anordnung an, sondern eine umgekehrt T-förmige (bei welcher *ABp* mit *EMS* und *P₂* in Kontakt ist, *ABa* aber nur mit *ABp*, Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass erstens Adhäsion eine Rolle spielt, sobald die Geometrie der Eihülle stark von der ungestörten abweicht. Zweitens behält das Modell seine Gültigkeit, wenn die Adhäsion in die Zell-Zell-Wechselwirkung mit aufgenommen wird. Hierzu ist jedoch ein weiterer experimenteller Parameter *pro Zellkontakt* (α) nötig. Die Anzahl der nötigen Parameter steigt somit stark mit der Zellanzahl an. Da im Laufe dieser Arbeit nur die Zellanordnungen in ungestörten Embryonen mit dem Modell simuliert werden sollen, wird aus diesem Grund die Zelladhäsion nicht mit beachtet.

1.2. Fluoreszenz- und Lichtblattmikroskopie

Die optische Mikroskopie stellt eines der wichtigsten Werkzeuge der heutigen Lebenswissenschaften dar. Hier wird (i.A. sichtbares) Licht und eine Kombination optischer Elemente wie Linsen oder Spiegel verwendet, um eine vergrößerte Abbildung des zu untersuchenden Objektes zu erstellen. Diese kann dann entweder mit dem Auge, oder mittels einer Kamera bzw. allgemeiner einem Photodetektor aufgenommen werden.

Einen Spezialfall optischer Mikroskopie stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar [67]. Bei dieser wird die Probe oder Teile davon mittels fluoreszenter Farbstoffmoleküle (Fluorophore) markiert. Solche Moleküle können Licht bestimmter Wellenlänge absorbieren und daraufhin langwelligeres Licht emittieren. Hiermit lässt sich die räumliche bzw. raumzeitliche Fluorophordichte quantifizieren. Eine relativ neue Methode der Fluoreszenzmikroskopie ist die auch in dieser Arbeit verwendete Lichtblattmikroskopie, die sich durch eine raffinierte Art der Beleuchtung auszeichnet und erstmals nahezu schädigungsfrei dreidimensionale Langzeitaufnahmen lebender biologischer Proben erlaubt [68].

In diesem Kapitel wird zuerst allgemein auf Fluoreszenzmikroskopie eingegangen. Hierzu wird zuerst knapp das Phänomen der Fluoreszenz erläutert. Danach wird die allgemeine Ausnutzung derselben in Lichtmikroskopen und schließlich das Konzept der Lichtblattmikroskopie diskutiert. Dabei werden auch die Vorteile gegenüber anderen Methoden erörtert. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird schließlich der verwendete Aufbau detailliert beschrieben.

1.2.1. Fluoreszenz, Fluoreszenzmikroskopie und Lichtblattmikroskopie

Fluoreszenz, Fluorophore und Markierung

Als Fluoreszenz wird die spontane und isotrope Emission eines Photons von einem Atom oder Molekül infolge der Absorption eines einfallenden Photons verstanden. Da für die Fluoreszenzmikroskopie vor allem Moleküle als Farbstoff verwendet werden, beschränkt sich die folgende Diskussion auf diese. Fluoreszenz ist eine wohlverstandene Erscheinung, so dass die Diskussion zusätzlich knapp bleibt. Für eine Vertiefung sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen (siehe z.B. [67, 70, 71]).

Durch die Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge kann ein Molekül aus seinem elektronischen Singulett-Grundzustand S_0 in einen höheren elektronischen Zustand S_1 gebracht werden (siehe Jablonski-Diagramm in Abb. 1.9a). Die photonische Energie

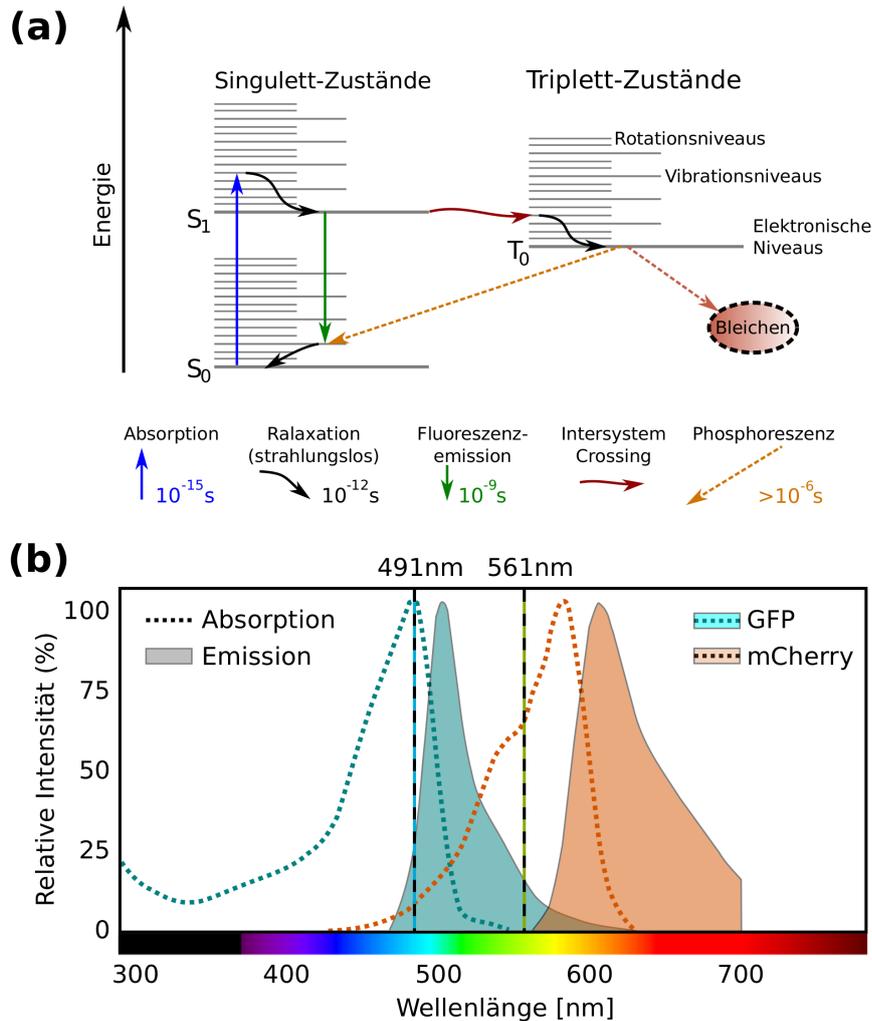


Abbildung 1.9.: Jablonski-Diagramm, Absorptions- und Emissionsspektren von GFP und mCherry. (a) Mit einem Jablonski-Diagramm lassen sich die Energieniveaus und charakteristische Übergänge eines Fluorophors veranschaulichen. Niveaus werden durch ihren elektronischen, rotatorischen und vibronischen Zustand beschrieben. Die Zeitskalen der typischen Übergänge sind angegeben, für eine Diskussion der Übergänge siehe Text. (b) Gezeigt sind die Absorptions- und Emissionsspektren (gestrichelt bzw. farblich hinterlegt) der beiden in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore *GFP* (türkis) und *mCherry* (orange). Senkrechte Linien geben die Wellenlängen der verwendeten Laser zur Fluoreszenzanregung an. Man erkennt, dass die beiden Spektren hinreichend weit auseinander liegen, um die Fluoreszenz beider gut trennen zu können. Abbildung gemäß [69].

geht dabei vollständig auf das Molekül über. Aufgrund des Franck-Condon-Prinzips befindet sich das Molekül in S_1 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im rotatorisch-vibronischen Grundzustand, sondern besitzt angeregte Rotations- und Vibrationsniveaus. Seine Energie ist somit gegenüber dem Grundzustand von S_1 erhöht. Typischerweise relaxieren diese angeregten Rotations- und Vibrationsniveaus allerdings schnell (siehe angegebene Zeitskalen in Abb. 1.9a) strahlungslos, z.B. durch Stöße mit umgebenden Molekülen, in den Grundzustand von S_1 .

Von diesem Zustand aus gibt es mehrere Möglichkeiten der weiteren Relaxation in den Zustand S_0 . Die Fluoreszenz selbst ist dabei der spinerlaubte Übergang unter Aussendung eines Photons, direkt in den Zustand S_0 . Da erneut das Franck-Condon-Prinzip gilt, wird sich das Molekül auch hier nicht sofort im Grundzustand von S_0 befinden, sondern über

angeregte Rotations- und Vibrationsniveaus verfügen, die im weiteren Verlauf strahlungslos relaxieren. Daraus folgt, dass das emittierte Photon eine geringere Energie hat als das absorbierte. Es hat somit eine rotverschobene Wellenlänge (*Stokes-Shift*). Diese Rotverschiebung ist mit für den Erfolg der Fluoreszenzmikroskopie verantwortlich, da damit das Anregungslicht vom emittierten Licht spektral unterschieden werden kann. Die Zeitskala, auf der Fluoreszenz stattfindet, beträgt einige Nanosekunden. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Fluoreszenz ist ihre Isotropie, d.h., die Richtung der einfallenden und re-emittierten Strahlung sind vollständig unkorreliert.

In Molekülen liegen die Rotations- und Vibrationsniveaus typischerweise dicht, so dass die möglichen Übergänge innerhalb eines elektronischen Zustandes zahlreich sind. Dies bedeutet sowohl für die Absorption als auch für die Emission eine starke Verbreiterung der Spektren (siehe auch Abb. 1.9b).

Neben der Fluoreszenz können weitere Prozesse auftreten. Desaktivierung der Anregung in S_1 kann prinzipiell auch strahlungslos durch thermische Abgabe der Energie an die Umgebung geschehen. Zudem kann das Molekül strahlungslos durch *Intersystem-Crossing* (IC), einem quantenmechanisch verbotenen, d.h. unwahrscheinlichen, Prozess von S_1 in den Triplett-Zustand T_0 wechseln. Da zum Erreichen des Grundzustandes S_0 ein erneutes Umklappen eines Elektronenspins nötig und dies wiederum quantenmechanisch verboten und somit unwahrscheinlich ist, ist die Zeitskala hier deutlich länger ($> \mu\text{s}$). Der Wechsel von T_0 nach S_0 erfolgt erneut durch Aussenden eines Photons (Phosphoreszenz). Während sich das Molekül in T_1 befindet, ist es inaktiv und kann nicht zur Fluoreszenz angeregt werden. Eine hohe IC-Rate ist daher bei der Fluoreszenzmikroskopie unerwünscht und stellt eine Anforderung an die verwendeten Fluorophore dar.

Angeregte Moleküle können zudem gebleicht, d.h. dauerhaft ihrer Fähigkeit zur Fluoreszenz beraubt werden. Dies geschieht meist durch chemische Wechselwirkung der angeregten Fluorophore mit ihrer Umgebung, wodurch Konformationsänderungen auftreten [71]. Da durch Bleichen die Signalintensität der untersuchten Probe sinkt, ist dies ein äußerst unerwünschter Effekt. Die Wahrscheinlichkeit für Bleichen ist vor allem in lebenden Proben im Triplett-Zustand am höchsten. Hier kann das Molekül mit molekularem Sauerstoff, dessen Grundzustand ebenfalls ein Triplett ist, wechselwirken und den Sauerstoff in einen reaktionsfreudigen Singulett-Zustand überführen [71]. Dieser hochreaktive Sauerstoff ist für lebende Proben giftig, die Folgen oftmals letal (Phototoxizität).

Aufgrund der eben diskutierten Eigenschaften der Fluorophore (IC-Rate, Bleichrate etc.) kommt diesen bei der Fluoreszenzmikroskopie eine große Bedeutung zu. Wünschenswert ist neben einer geringen IC-Rate und geringem Bleichen in der lebenswissenschaftlichen Forschung außerdem eine biologische Verträglichkeit, d.h., die Farbstoffe dürfen für die untersuchte Probe nicht *per se* giftig sein. Letzteres ist insbesondere bei fluoreszenten Proteinen erfüllt. Ein weiterer Vorteil dieser ist, dass sie durch genetische Veränderungen an der Probe von der Probe selbst exprimiert werden können. In dieser Arbeit werden zwei Farbstoffe verwendet, beides sind fluoreszente Proteine (die entsprechenden Gene wurden den verwendeten Wurmlinien stabil ins Erbgut eingepflanzt, stabile Transfektion, siehe Kap. 2.1). Dies ist zum einen *GFP* (*green fluorescent protein*), zum anderen *mCherry*. Die Absorptions- und Emissionsspektren beider sind in Abb. 1.9b abgebildet.

Fluoreszenzmikroskopische Standardmethoden

Aufgrund der Rotverschiebung der emittierten Strahlung ist die Fluoreszenz gut für die Nutzung zur optischen Mikroskopie geeignet. Mittels Filtern kann dort die Anregungsstrahlung von der Fluoreszenz getrennt werden, so dass nur das von Fluorophoren re-emittierte Licht zum Detektor gelangt. Somit kann bei der Fluoreszenzmikroskopie die

räumliche bzw. raumzeitliche Fluorophordichte quantifiziert werden. Zusammen mit den heute vorhandenen Möglichkeiten der Fluoreszenzmarkierung, d.h. der spezifischen Kombination beliebiger Proteinfamilien mit Fluorophoren, ergeben sich so die großen Vorteile, die die Fluoreszenzmikroskopie mit sich bringt: Die räumliche Verteilung und Dynamik eines zu untersuchenden Proteins bzw. einer Proteinfamilie ist somit prinzipiell (innerhalb der optischen Auflösung) zugänglich.

Die beiden heute am weitesten Verbreiteten Bauarten der Fluoreszenzmikroskope sind das Epifluoreszenzmikroskop (eine spezielle Art eines Weitfeldmikroskops) sowie das konfokale Mikroskop. An dieser Stelle sollen sie nur so weit diskutiert werden, dass ihre Vor- und Nachteile sichtbar werden. Für eingehendere Beschreibungen sei wieder auf die reichhaltige Literatur verwiesen (z.B. [67, 71]).

Beim Epifluoreszenzmikroskop wird die gesamte Probe durch ein Objektiv beleuchtet. Dasselbe Objektiv sammelt den zurückgeworfenen Teil der Fluoreszenz auf. Ein Filter trennt das Anregungslicht von der Fluoreszenz, so dass nur letzteres von dem Okular auf den Kamerasensor abgebildet werden kann. Wegen der Verwendung einer Kamera kann somit eine Ebene gleichzeitig aufgenommen werden, was die Epifluoreszenzmikroskopie zu einer relativ schnellen Technik macht. Es wird jedoch immer die gesamte Probe beleuchtet, und eine Tiefendiskriminierung findet nur durch die Schärfentiefe des Objektives statt. Fluoreszenz von ober- oder unterhalb der Fokalebene des Objektives wird nur unscharf auf den Sensor abgebildet. Hierdurch wird allerdings der Kontrast der Aufnahmen stark vermindert. Insgesamt eignet sich die Epifluoreszenzmikroskopie damit nicht für dreidimensionale Aufnahmen.

Die zweite Standardtechnik ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Als punktförmige Lichtquelle dient ein Laserstrahl, der eine Lochblende passiert und mit einem Objektiv auf einen Punkt in der Probe fokussiert wird. Die Fluoreszenz der Probe in diesem Punkt, aber auch aus Regionen unter und über dem Fokus, werden wieder vom selben Objektiv gesammelt und mittels eines dichroitischen Spiegels vom rückgestreuten Anregungslicht getrennt. Mit einer Tubuslinse wird die Fluoreszenz auf eine weitere Lochblende abgebildet (der Mittelpunkt der Blende ist *konfokal* zum Beleuchtungspunkt in der Probe). Hierbei wird Fluoreszenz von Gebieten außerhalb des Anregungsfokus unscharf abgebildet und folglich größtenteils geblockt. Hinter der Lochblende wird die Fluoreszenzintensität mit einem Photodetektor quantifiziert (APD oder PMT). Somit erlaubt die konfokale Mikroskopie eine deutlich bessere Tiefendiskriminierung als die Epifluoreszenzmikroskopie, es wird nur die Fluoreszenz aus einem kleinen Volumen (dem sog. konfokalen Volumen) gemessen. Jedoch wird immer nur ein einziger beugungsbegrenzter Punkt gleichzeitig abgebildet, so dass die Probe für ein Bild abgerastert werden muss. Aus diesem Grund ist die konfokale Mikroskopie (in ihrer ursprünglichen Form als Rastermikroskopie) relativ langsam. Abhilfe schafft eine Weiterentwicklung, das Spinning-Disk-Mikroskop, bei welchem im Wesentlichen eine massive Erhöhung der Anzahl gleichzeitig vorhandener konfokaler Volumen stattfindet [72]. Dies reduziert die Bildaufnahmedauer enorm. Aufgrund der hohen Tiefendiskriminierung sind prinzipiell alle konfokalen Techniken zur Aufnahme dreidimensionaler Bilder geeignet.

Ein wesentlicher Nachteil der konfokalen Mikroskopie (ebenso wie der Epifluoreszenzmikroskopie) ist, dass zur Aufnahme einer einzelnen zweidimensionalen Ebene immer die gesamte Probe beleuchtet wird. Sollen nun dreidimensionale Aufnahmen mit z.B. n Ebenen erstellt werden, wird folglich die Probe n mal in ihrer Gesamtheit belichtet. Dies führt zu signifikantem Bleichen, selbst wenn der Lichteintrag durch verschiedene Optimierungen weitestmöglich vermindert wird. Insofern sind beide Techniken für Langzeitaufnahmen mit

einer hohen Zeitaufösung nur bedingt geeignet: eine hohe Bildwiederholrate schränkt die mögliche Aufnahmedauer ein und umgekehrt.

Lichtblattmikroskopie

Einen Ausweg aus dem geschilderten Dilemma stellt die Lichtblattmikroskopie dar, die dreidimensionale Aufnahmen mit hoher Auflösung - sowohl räumlich als auch zeitlich - über große Zeitspannen erlaubt. Die grundlegende Idee hinter der Technik entstand bereits 1903 [73]. Jedoch dauerte es bis zum Jahr 1993, bis die Lichtblattmikroskopie als Fluoreszenztechnik verwendet wurde [74] und bis zum Jahr 2004, bis die Lichtblattmikroskopie in ihrer heute verwendeten Grundform, SPIM (*selective plane illumination microscopy*), entwickelt wurde [75]. Insofern ist sie immer noch eine recht junge Technik, die ständig weiterentwickelt wird (siehe [68, 76–79] für aktuelle Entwicklungen).

Die grundlegende Idee der Lichtblattmikroskopie ist die Verwendung separater, orthogonal angeordneter Objektive zur Beleuchtung der Probe und zur Detektion der Fluoreszenz. Ein einfacher Aufbau ist in Abb. 1.10a schematisch gezeigt. Mittels einer Zylinderlinse und einem anschließenden Objektiv wird ein Laserstrahl zu einem Lichtblatt deformiert, d.h., der Strahl wird nur in einer Dimension fokussiert. Das Lichtblatt hat in seiner Taille typischerweise eine Dicke von wenigen μm . Die so in der Probe angeregte Fluoreszenz wird von einem zweiten Objektiv (Detektionsobjektiv) aufgesammelt. Die Fokalebene des Detektionsobjektivs muss dabei der Lichtblattebene entsprechen. Ein Filter trennt das Signal von gestreutem Anregungslicht, bevor es mit einer Tubuslinse auf einen Kamerasensor abgebildet wird. Somit kann eine zweidimensionale Ebene der Probe aufgenommen werden. Durch eine Verschiebung der Probe relativ zum Lichtblatt können daher dreidimensionale Schichtaufnahmen erstellt werden.

Trotz dem einfachen Funktionsprinzip bietet die Lichtblattmikroskopie signifikante Vorteile gegenüber Epifluoreszenz- und konfokaler Mikroskopie bei 3D-Langzeitaufnahmen lebender Proben mit hoher Zeitaufösung, Abb. 1.10b verdeutlicht dies schematisch. Die Signaldetektion bei SPIM entspricht im Wesentlichen der eines Weitfeld- oder Epifluoreszenzmikroskops. Insbesondere ist daher SPIM eine schnelle Technik, da immer eine gesamte zweidimensionale Bildebene gleichzeitig aufgenommen wird. Ein volles, dreidimensionales Abbild der Probe kann daher schon innerhalb kurzer Zeit generiert werden (~ 1 s). Im Vergleich zu einem konfokalen Rastermikroskop ist dies um mehr als eine Größenordnung schneller [80]. Verglichen mit der Epifluoreszenzmikroskopie besticht SPIM auch durch einen deutlich höheren Kontrast. Dies liegt am intrinsischen *optical sectioning*: Es wird immer nur diejenige Schicht der Probe angeregt, die auch scharf abgebildet werden kann. Fluoreszenz von außerhalb der Fokalebene des Detektionsobjektivs tritt daher gar nicht erst auf. Der größte Vorteil von SPIM gegenüber konventionellen Methoden folgt ebenfalls aus der Art der Beleuchtung: Um eine dreidimensionale Aufnahme der Probe, bestehend aus n 2D-Schichten, zu erstellen, muss jeder Ort der Probe nur einmal angeregt werden. Im Gegensatz hierzu wird jeder Ort der Probe bei anderen Techniken n -mal angeregt. Folglich wird das Bleichen der Fluorophore um etwa einen Faktor n reduziert, selbiges gilt für die Phototoxizität. Typische Werte für n bei *C. elegans* liegen im Bereich (30-50). Daraus folgt, dass (unter Vernachlässigung der Produktion neuer Fluorophore von der Probe selbst) die Probe etwa um diesen Faktor öfter aufgenommen werden kann. Somit sind 3D-Aufnahmen mit hoher Zeitaufösung über lange Zeitspannen erstmals möglich. Das Bleichen und die Phototoxizität sind tatsächlich so gering, dass Embryonen von *C. elegans* nach einer Aufnahme mit einigen tausend dreidimensionalen Aufnahmen ohne erkennbare Abweichungen schlüpfen [81].

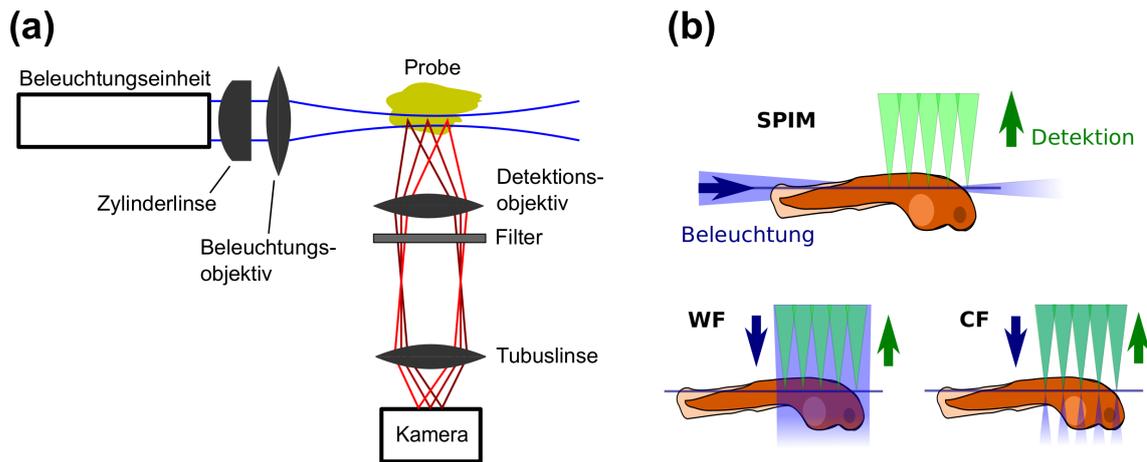


Abbildung 1.10.: Prinzipieller Aufbau eines SPIM und Vorteile gegenüber anderen Mikroskopen. (a) Minimaler SPIM-Aufbau. Eine Kombination aus Zylinderlinse und Objektiv erzeugt ein schmales Lichtblatt (nur in einer Dimension fokussierter Strahl) in der Probe. Dessen Fluoreszenz wird von einem zweiten, orthogonal angeordneten Objektiv aufgefangen. Ein Filter absorbiert gestreutes Anregungslicht, bevor das Signal von einer Tubuslinse auf eine Kamera abgebildet wird. (b) Schematische Gegenüberstellung von Lichtblattmikroskopie (SPIM), Weitfeld-/Epifluoreszenzmikroskopie (WF) und konfokaler Mikroskopie (CF). Der Weg des Anregungslichtes ist in blau, die Fluoreszenz in grün eingezeichnet. Durch die besondere Art der Beleuchtung kombiniert SPIM die gute Tiefendiskriminierung konfokaler Mikroskopie mit der Geschwindigkeit der Epifluoreszenzmikroskopie. Zudem wird der Lichteintrag in die Probe um ein bis zwei Größenordnungen reduziert, da nur die Ebene beleuchtet wird, die auch scharf abgebildet werden kann. Details siehe Text. Abbildung adaptiert von [82].

1.2.2. Beschreibung des Aufbaus

Dieses Kapitel widmet sich der Beschreibung des in dieser Arbeit verwendeten Aufbaus. Eine erste Rohfassung desselben wurde während der Diplomarbeit von Michael Schaub 2011 - 2012 aufgebaut [83]. Während der Diplomarbeit von Philipp Struntz 2012 - 2013 wurde das SPIM automatisiert und zum Teil rekonzipiert [84]. Während der nachfolgenden Arbeiten als Doktorand wurden und werden weiterhin von Philipp Struntz Ergänzungen wie etwa der Einbau eines zweiten Kanals oder eine Möglichkeit der Temperaturkontrolle vorgenommen [85]. Für eine umfassendere Beschreibung des Aufbaus, als sie hier angegeben werden kann, sei daher auf die genannten Arbeiten verwiesen.

Das Mikroskop wurde dezidiert für die Untersuchung der Embryogenese des *C. elegans* entworfen. Um eine möglichst einfache Probenvorbereitung sicherzustellen, wurde der Aufbau als sog. *iSPIM* (*inverted SPIM*) [81] realisiert. Hierbei kann die Probe schlicht auf einem waagrecht montierten Deckgläschen in das Mikroskop eingebracht werden, da die beiden Objektive unter einem 45° -Winkel in einer Ebene senkrecht zur Tischplatte montiert sind (siehe auch Abb. 1.11, Einfügung). Dies hat weiterhin den Vorteil, dass der Embryo nicht in einer Haltevorrichtung, z.B. einem Agarosezylinder, eingebettet werden muss, wie dies bei einer waagrecht Montage der Objektive der Fall ist (siehe z.B. [75, 86, 87]). Damit werden Abbildungsfehler durch unterschiedliche Brechungsindizes der Agarose und des umgebenden Wassers vermindert. Weiterhin gehört das Mikroskop zur Klasse der *DSLIM* (*digital scanned laser light-sheet fluorescence microscope*, [88]), d.h., das Lichtblatt wird nicht mittels einer Zylinderlinse erzeugt, sondern durch das Scannen eines Gaußstrahls (siehe unten). Dies sorgt für eine homogenere Ausleuchtung der Probe.

Eine Skizze des aktuellen Setups ist in Abb. 1.11 gezeigt. Eine Liste mit den konkret verwendeten Bauteilen findet sich in [85], daher wird hier größtenteils auf die Angabe

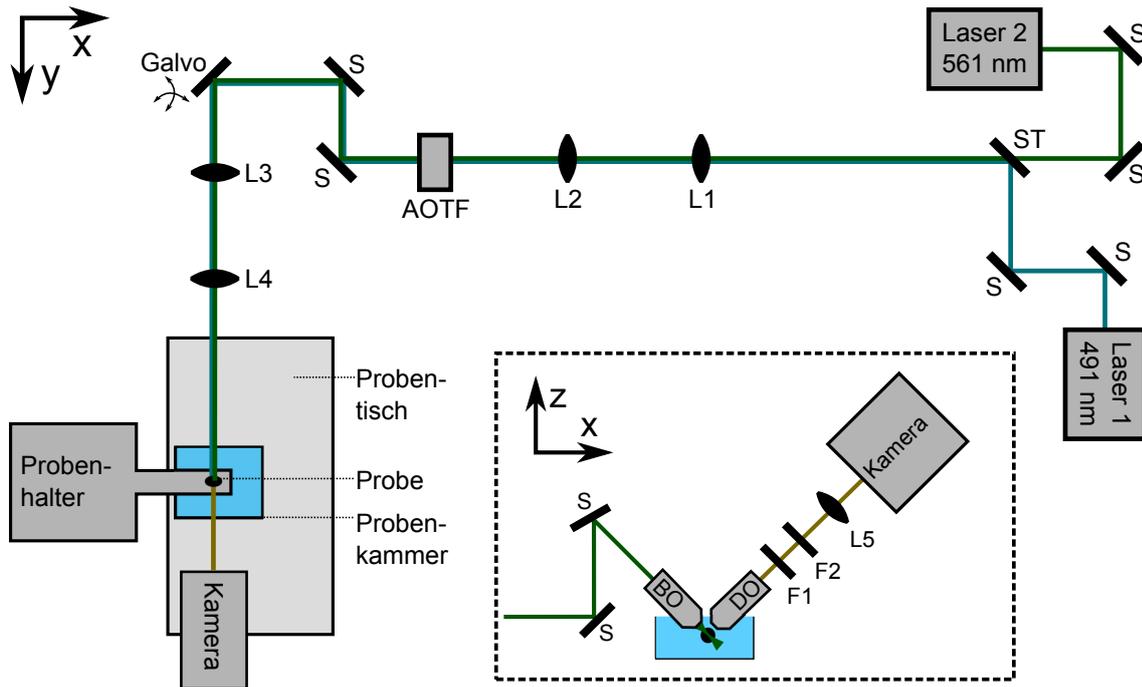


Abbildung 1.11.: Setup des verwendeten Lichtblattmikroskops. Gezeigt ist die Anordnung der Komponenten in Aufsicht (xy - bzw. Tischebene). Die Laser 1 und 2 werden über Spiegel S und einen Strahlteiler ST auf eine gemeinsame Achse gebracht. Der Teleskopstrahlengang aus L_1 und L_2 weitet die Strahlen auf, was zur Regulierung der Lichtblattdicke dient. Der AOTF dient zur Regulierung der in die Probe eingebrachten Intensität. Mit Spiegeln werden die beiden Strahlen auf ein galvanometrisches Spiegelpaar gelenkt. Mit diesem Spiegelpaar wird das Lichtblatt digital in die Probe geschrieben (DSL_M, [88]). Die Linsen L_3 und L_4 konvertieren die Winkelablenkung durch die Galvospiegel in einen lateralen Versatz. Ab hier sind die optischen Komponenten auf einem vertikalen Breadboard montiert (**Einfügung**). Zwei Spiegel werfen die Strahlen auf die rückwärtige Apertur des Beleuchtungsobjektives BO , in dessen Fokus die Probe platziert wird. Das Signal wird vom Detektionsobjektiv DO aufgefangen, mit den Filtern F_1 und F_2 von gestreutem Anregungslicht getrennt und schließlich mittels einer Tubulinse L_5 auf die Kamera abgebildet. Details siehe Text.

der Produktnamen und Hersteller verzichtet. An der selben Stelle findet sich auch eine eingehende Schilderung der Justage des Aufbaus. Die Probenvorbereitung sowie der Ablauf bei der Erstellung von Aufnahmen wird in Kap. 2.1 behandelt.

Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang. Der gesamte Aufbau ist auf einem passiv gedämpften optischen Tisch realisiert. Als Lichtquelle dienen zwei Dauerstrich-Festkörperlaser mit den Wellenlängen 491 nm und 561 nm (Maximalleistung je 50 mW). Der erste Laser dient zur Anregung von *GFP*, während der zweite zur Anregung von *mCherry* verwendet wird. Die Strahlen der beiden Laser werden über jeweils zwei Spiegel sowie einen Strahlteiler (Dichroit) parallel zum optischen Tisch und aufeinander ausgerichtet, so dass sie auf einer gemeinsamen optischen Achse liegen. Als nächstes folgen die beiden Linsen L_1 und L_2 , die zusammen einen Teleskopstrahlengang zur Strahlaufweitung ergeben. Die Strahlaufweitung beeinflusst die Ausleuchtung der rückwärtigen Apertur des Beleuchtungsobjektives und damit die Lichtblattdicke. Daher muss die Kombination der beiden Brennweiten $f_{1/2}$ von $L_{1/2}$ an die jeweiligen Anforderungen angepasst werden. Für Langzeitaufnahmen eines kompletten *C. elegans*-Embryos wurden $f_1 = 50$ mm und $f_2 = 150$ mm verwendet (dies ergibt eine dreifache Strahlaufweitung).

Nach dem Teleskopstrahlengang treffen die Strahlen auf einen AOTF (*acousto-optical tunable filter*). In diesem Bauteil wird durch eine Schallwelle in einem Kristall ein optisches Gitter erzeugt. Die Strahlen passieren dieses Gitter und werden daran gebeugt. Durch Interferenz entstehen so Nebenmoden, die in ihrer Intensität durch die Schallwelle schnell modulierbar sind. Nach dem AOTF werden die Strahlen der ersten Nebenmode verwendet, das Maximum nullter Ordnung hingegen geblockt. Der AOTF wird verwendet, um die Strahlen (die ersten Nebenmoden) zu blocken, so lange die Kamera nicht aktiv ist. Dies dient zu Reduzierung des Lichteintrages in die Probe und damit zur Reduzierung des Bleichens. Da der AOTF kurze Reaktionszeiten hat (keine mechanisch beweglichen Teile), wird das Licht auch während der kurzen Phase der Probenverschiebung geblockt.

Nach dem AOTF werden die Strahlen mit zwei weiteren Spiegeln wieder parallel zum optischen Tisch ausgerichtet und treffen als nächstes auf ein galvanometrisches Spiegelpaar (Galvospiegel). Die Spiegel können mittels des Anlegens einer Spannung in ihrer Winkelposition verstellt werden und so die Strahlen steuerbar ablenken. Die beiden Spiegel stehen zueinander orthogonal, so dass die Strahlen in zwei Richtungen voneinander unabhängig angelenkt werden können. Die Galvospiegel werden verwendet, um die Strahlen während der Belichtungszeit der Kamera einmal hin- und zurückzufahren, so dass das gesamte Sichtfeld zweimal von einem Gaußstrahl ausgeleuchtet wird. Hierdurch kann auf eine Zylinderlinse verzichtet werden, wodurch eine homogenere Ausleuchtung und damit eine gesteigerte Bildqualität erreicht wird.

Um die Winkelablenkung der Strahlen nach dem Galvospiegel in den eben beschriebenen Versatz über das Sichtfeld zu verwandeln, folgen nun zwei weitere Sammellinsen L_3 und L_4 ($f_3 = 100$ mm und $f_4 = 300$ mm). Die beiden Linsen sind mit dem Galvospiegel und dem Beleuchtungsobjektiv gemäß dem telezentrischen Prinzip angeordnet [88], d.h., ihre Abstände entsprechen der jeweiligen Summe der Brennweiten.

Die weiteren Elemente des Anregungsstrahlenganges befinden sich nun auf einem vertikal montierten sog. *Breadboard* (Steckboard, Abb. 1.11, Einfügung). Zuerst werden die Strahlen über zwei Spiegel nach oben versetzt und auf das unter einem 45° -Winkel bzgl. der Vertikalen montierte Beleuchtungsobjektiv projiziert. Dieses Wasserimmersionsobjektiv hat eine zehnfache Vergrößerung und einen Arbeitsabstand von 3,6 mm (*HGX APO L 10 \times /0.30 W U-V-I*, Leica Microsystems). Im Fokus dieses Objektivs wird die Probe platziert (siehe nächster Abschnitt).

Die in der Probe angeregte Fluoreszenz wird vom Detektionsobjektiv, welches orthogonal zum Beleuchtungsobjektiv montiert ist (Abb. 1.11), aufgesammelt. Das Detektionsobjektiv ist ebenfalls ein Wasserimmersionsobjektiv, hat eine 40-fache Vergrößerung bei einer numerischen Apertur von 0,8 und einen Arbeitsabstand von 3,3 mm (*HGX APO 40 \times /0.80 W U-V-I*, Leica Microsystems). Bei der Justage muss genau darauf geachtet werden, dass der Fokus des Beleuchtungsobjektivs in der Fokalebene des Detektionsobjektivs liegt. In diesem Fall wird das Lichtblatt scharf abgebildet. Die Position des Detektionsobjektivs ist daher über Linearverschiebetische manuell justierbar.

Nach dem Detektionsobjektiv passiert das detektierte Signal zwei in einem Filterrad montierte Filter $F_{1/2}$. Für Zweikanalaufnahmen mit *GFP* und *mCherry* als Fluorophore wird eine Filterkombination verwendet, bei der F_1 ein Kantenfilter mit Transmission im Bereich 505 nm bis 900 nm und F_2 ein Notch-Filter zur Blockierung des Anregungslichtes bei 561 nm ist. Mit dieser Kombination können folglich ohne Filterwechsel beide Kanäle sequenziell aufgenommen werden, ohne dass Anregungslicht die Filterkombination passieren kann.

Nach den Filtern bildet die Tubuslinse L_5 ($f_5 = 200$ mm) das vom Detektionsobjektiv kollimierte Signal auf die sich dahinter befindende Kamera (*ORCA-Flash 4.0*, Ha-

mamatsu) ab. Diese besitzt einen *sCMOS*-Sensor (*scientific complementary metal-oxide-semiconductor*) mit 2048×2048 Pixeln. Der Pixelabstand beträgt laut Herstellerangabe $6,5 \mu\text{m}$, die Quanteneffizienz (65 - 70)% im Bereich (500 - 600)nm. Bei voller Bildgröße können (bei der Verwendung eines *frame-grabbers* zur Verbindung an den PC) etwa 100 Bilder pro Sekunde ausgelesen werden.

Aus der Kombination des Pixelabstandes auf dem Kamerachip von $6,5 \mu\text{m}$ mit dem Detektionsobjektiv, das eine 40-fache Vergrößerung erzeugt, ergibt sich die theoretische Pixelbreite $l_{x/y}$ im Objektraum (d.h. die von einem Pixel repräsentierte Länge in der Probe) zu $l_{x/y} = 162,5 \text{ nm}$. Während der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors wurde dieser Wert auf $l_{x,y} = (161 \pm 3) \text{ nm}$ gemessen. In dieser Arbeit wird generell mit einem Wert $l_{x,y} = 161 \text{ nm}$ gearbeitet. Bei dreidimensionalen Aufnahmen kommt hierzu noch die Höhe eines Voxels l_z . Diese hängt jedoch nicht von der Kamera und dem Objektiv, sondern von der Verschiebung der Probe zwischen zwei Aufnahmen ab (siehe nächster Abschnitt).

Probenkammer und Probenpositionierung. Da mit dem SPIM lebende Proben untersucht werden, müssen sich diese während der Messungen in wässriger Lösung bzw. einer Pufferlösung befinden, um vor Austrocknung geschützt zu sein. Daher befindet sich unterhalb der Objektive eine Kunststoffkammer, die mit Wasser/Puffer gefüllt werden kann. Der Boden der Kammer besteht aus Aluminium, auf dessen Unterseite ein Peltier-Element angebracht ist. Mit diesem kann die Bodenplatte und somit die gesamte Probenkammer samt Probe geheizt werden. Zur Temperaturkontrolle ist das Peltierelement mit einem Regelkreis mit Widerstandsthermometer verbunden. Das Thermometer wird während Messungen in die Flüssigkeit in der Probenkammer getaucht. Über ein Bedienelement kann sodann eine Soll-Temperatur eingestellt werden. Die Stabilität der Temperaturkontrolle erreicht etwa $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ (siehe auch Kap. 2.1). Die gesamte Anordnung aus Probenkammer und Peltierelement ist auf einer Hebebühne montiert, so dass die Kammer zur Probeneinbringung herunter- und zur anschließenden Messung heraufgefahren werden kann.

Der Probenhalter selbst besteht im Wesentlichen aus drei Linearverschiebetischen, einem Piezo-Nanopositionierer und einem Probenträger. Zwei der Linearverschiebetische sind motorisiert und dienen dem Verfahren der Probe in x - und y -Richtung (in der Tischebene). Beide besitzen eine minimale Schrittweite von 99 nm und einen maximalen Verschieberegion von 28 mm . Die Einstellung der groben Höhe der Probe (z -Position) erfolgt über den dritten, manuellen Linearverschiebetisch (Verschieberegion 10 mm). Zum Verschieben der Probe relativ zum Lichtblatt während dreidimensionaler Aufnahmen kommt ein Piezo-Nanopositionierer (Verschieberegion $100 \mu\text{m}$, Wiederholgenauigkeit 5 nm) zum Einsatz. Die Verschiebung der Probe erfolgt senkrecht zur Tischebene und schließt damit mit der Bildebene einen 45° -Winkel ein. Bei einer Probenverschiebung mit dem Nanopositionierer um Δz folgt daraus, dass der Abstand der aufgenommenen zweidimensionalen Ebenen bei dreidimensionalen Bildstapeln und damit die Höhe der Voxel gleich $l_z = \Delta z / \sqrt{2}$ ist. Die Probe selbst wird auf einem Deckgläschen auf dem Probenträger fixiert (Kap. 2.1). Dieser ist an dem Nanopositionierer befestigt und stellt eine Steg-artige Verlängerung dar, so dass der Nanopositionierer nicht mit den Objektiven kollidiert.

Zudem steht eine LED-Lampe mit verstellbarem Teleskoparm zur Verfügung, mit der eine seitliche Aufsichtbeleuchtung realisiert werden kann. Dies dient der schnelleren Probenfindung.

Optische Eigenschaften, Auflösung. Der Bestimmung der optischen Eigenschaften des Aufbaus wie etwa der Lichtblattstärke und der erreichten Auflösung wird in [1, 84, 85] breiter Raum eingeräumt. Für die vorliegende Arbeit ist die tatsächliche Auflösung des

Mikroskops von untergeordnetem Rang, da die beobachteten Strukturen (Zellkerne, Zellen) deutlich über der Auflösungsgrenze liegen. Daher sollen hier nur die Ergebnisse angegeben werden.

Die Lichtblattdicke (bzw. die Dicke des gescannten Gaußstrahls) wird durch die Aufnahme des Strahlprofils in einer homogenen Fluorophorlösung mit einem in der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors entwickelten Programm bestimmt. Für den aktuellen Aufbau beträgt die Lichtblattdicke an der schmalsten Stelle etwa $(1,2 \pm 0,2)\mu\text{m}$ (FWHM) bei einer Rayleighlänge von $8,8\mu\text{m}$.

Zur Bestimmung der Auflösung wurde ebenfalls in der Diplomarbeit des Autors ein Programm entwickelt. Anhand der Aufnahme kleiner, fluoreszenter Polystyrolkugeln kann damit die Punktspreizfunktion (PSF) abgeschätzt werden. Für den aktuellen Aufbau ergeben sich die Abmessungen der PSF und damit die Auflösung in lateraler Richtung zu $(434 \pm 42)\text{nm}$ (FWHM), in axialer Richtung beträgt die Auflösung $(1130 \pm 243)\text{nm}$ (FWHM). Alle Werte wurden von Philipp Struntz gemessen und beziehen sich auf die schmalste Stelle des Lichtblattes.

Steuerung des Aufbaus. Die Ansteuerung der einzelnen Komponenten erfolgt per PC und ist ausführlich in [85] beschrieben. Die Kontrolle der einzelnen Komponenten ist über eine von Philipp Struntz erstellte LabVIEW-Umgebung möglich (für Laser, AOTF, Galvospiegel, Linearverschiebetische, Nanopositionierer), zur Steuerung der Kamera wird das Programm HoKaWo (Hamamatsu) verwendet.

Ausgabe und grobe Weiterverarbeitung der Aufnahmen. Nachdem eine Langzeitaufnahme abgeschlossen ist, werden alle einzelnen Bilder in separaten Dateien (TIF-Format) gespeichert. Aufgrund des oben bereits angesprochenen 45° -Winkels zwischen Verschiebungsachse des Nanopositionierers und Bildebene weisen die einzelnen Ebenen eines dreidimensionalen Bildstapels einen lateralen Versatz auf, der korrigiert werden muss. Dies erfolgt mit einem Matlab-Programm, das in der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors entwickelt wurde (*SPIMpac*, siehe [1]). Dabei werden die Bilder auch zu Stapeln (Multi-TIF) zusammengefasst. Jeder Bildstapel liegt dann in einer separaten Datei vor. Bei Zweikanalaufnahmen wird für jeden Zeitpunkt eine Datei pro Kanal erstellt.

Material & Methoden

In diesem Kapitel werden die Materialien, Methoden und Algorithmen, die bei der Erstellung dieser Arbeit Verwendung fanden, vorgestellt und diskutiert. Kap. 2.1 behandelt alle experimentellen Protokolle, von der Haltung und Manipulation der Würmer bis hin zur Erstellung von Langzeitaufnahmen im SPIM. In Kap. 2.2 werden die entwickelten Algorithmen zur Bildverarbeitung detailliert vorgestellt und diskutiert. Die Auswertung und Interpretation der damit gewonnenen Daten zur Beantwortung biologischer Fragestellungen ist hingegen Gegenstand von Kap. 3.

2.1. Experimentelle Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Wurmlinien und deren Haltung vorgestellt. Zudem wird das Standardvorgehen bei der Probenpräparation und den anschließenden Bildaufnahmen erläutert. Schließlich wird auf die verwendeten Methoden zur Kontrolle der Umgebungstemperatur, zur Entfernung der Eihülle und zum gezielten Ausschalten bestimmter Gene mittels RNA-Interferenz eingegangen.

2.1.1. Wurmlinien und -kultur

Im Laufe dieser Arbeit wurden Experimente an drei verschiedenen Wurmlinien durchgeführt, welche über das *Caenorhabditis Genetics Center* bezogen wurden [26]. Alle verwendeten Fluoreszenzmarkierungen sind stabil transfiziert. Linie XA3501 verfügt über fluoreszent markierte Histone (wichtige Proteine für die DNA-Verpackung) und markiertes Tubulin (GFP::H2B + GFP::tbb-2, siehe auch [89]), sichtbar sind folglich Chromosomen sowie der Spindelapparat. Linie OD58 verfügt über eine GFP-Markierung an dem peripheren Membranprotein PLC1 δ 1 (GFP::PH(PLC1 δ 1), siehe [90]). Bei dieser Linie weisen somit die Plasmamembranen eine hohe, das Cytoplasma eine geringere Fluoreszenzintensität auf. Die dritte Linie, OD95, verfügt über GFP-markierte Plasmamembranen sowie über eine mCherry-Markierung der Histone (GFP::PH(PLC1 δ 1) + mCherry::his58, siehe [91]). Exemplarische Aufnahmen der drei Linien sind in Abb. 2.1 gezeigt. Alle Experimente bis Dezember 2015 wurden an den Linien XA3501 und OD58 durchgeführt. Nachdem das SPIM um einen Laser der Wellenlänge 561 nm erweitert wurde, wurde ausschließlich an Embryonen der Linie OD95 gemessen.

Die Würmer werden standardmäßig auf NGM-Platten (*nematode growth medium*, siehe [92]) bei 20,5 °C kultiviert. Bevor Würmer auf die Platten aufgebracht werden, wird auf diesen ein Rasen aus *E. coli OP50* Bakterien ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

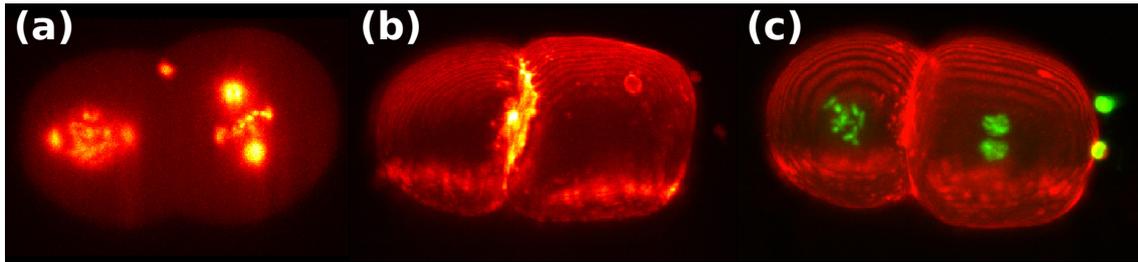


Abbildung 2.1.: Exemplarische Aufnahmen der drei verwendeten transgenen Wurmlinien (a) Maximumintensitätsprojektion eines dreidimensionalen Bildstapels eines Embryos der Linie XA3501. Sowohl Histone als auch Tubulin sind mit GFP markiert. (b) Wie (a), allerdings ist ein Embryo der Linie OD58 gezeigt. In dieser ist die Plasmamembran mit GFP markiert. (c) Embryo der Linie OD95. Plasmamembranen (rot) sind mit GFP, Histone (grün) mit mCherry markiert. Alle Embryonen sind etwa 50 µm lang.

Würmer werden etwa alle drei bis sieben Tage auf frische Platten umgesetzt. Dies geschieht mittels “*Chunking*”, d.h., ein Stück Agar, auf welchem sich einige Würmer befinden, wird mit einem sterilen Skalpell aus der alten Platte ausgeschnitten und auf die neue aufgebracht. Eine detaillierte Übersicht über Techniken der Wurmkuivierung findet sich in [92].

2.1.2. Probenpräparation und Bildaufnahmen

Vor der Probenpräparation werden Deckgläschen (rund, Durchmesser 15 mm, die Dicke spielt keine Rolle) mit einer Poly-L-Lysin-Beschichtung vorbereitet. Hierzu wird ein etwa 30 µl großer Tropfen Poly-L-Lysin an den Rand eines jeden Deckgläschens aufpipettiert. Nachdem die Tropfen getrocknet sind, werden die Deckgläschen bei 4 °C aufbewahrt. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung sorgt dafür, dass die Eier auf dem Deckgläschen adhären und beim Transfer in das SPIM nicht verloren gehen.

Die Probenpräparation findet unter einem Seziernmikroskop (*Leica S8 AOP*) statt. Auf einen Objektträger werden mehrere etwa 90 µl große Tropfen M9-Puffer aufgebracht (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 1 ml 1 M MgSO_4 , mit Reinstwasser auf 1 l auffüllen, siehe [92]). Auf einen zweiten Objektträger wird ein beschichtetes Deckgläschen gelegt. Von einer bevölkerten Platte wird ein junger adulter Hermaphrodit ausgewählt und mit einem vorher abgeflammt Platindraht in einen der M9-Tropfen umgesetzt. Geeignete Würmer verfügen idealerweise über linear und parallel angeordnete Eier (vgl. Abb. 1.4b). In älteren Würmern liegen die Eier ungeordnet (vgl. Abb. 1.4a), dort findet sich meist kein frisch befruchteter Embryo. Der Wurm wird nun in dem Tropfen mit zwei Kanülen mittig zerteilt, so dass die Eier herausquellen. Meist bleiben einige Eier in den beiden Wurmhälften zurück. Diese werden mit den Kanülen vorsichtig herausgestreift. Ein geeigneter Embryo (vor dem *pronuclear meeting*) wird ausgewählt und mit einer dünnen Glaskapillare mit angeschlossenem Peleusball auf das beschichtete Deckgläschen mittig in den eingetrockneten Poly-L-Lysin-Tropfen transferiert. Dabei sollten etwa 10 µl M9-Puffer mit umgesetzt werden, um ein Austrocknen des Embryos zu verhindern. Mit einem wasserfesten, dünnen Marker wird die Lage des Embryos (lange und kurze Achse) auf dem Deckgläschen markiert, so dass er im SPIM schneller gefunden werden kann.

Das Deckgläschen wird nun auf dem Probenhalter des SPIM mittels Vakuumfett fixiert. Optimal ist dabei eine Orientierung des Embryos, bei der dessen lange Achse senkrecht zur optischen Achse des Beleuchtungsobjektivs steht. In diesem Fall kann der Embryo vollständig entlang des dünnsten Teils des Lichtblattes aufgenommen werden. Der Em-

Parameter	Typischer Wert
Laserleistung P_1 (491 nm)	50 mW
Laserleistung P_2 (561 nm)	50 mW
AOTF-Spannung V_1 (491 nm)	0,4 V
AOTF-Spannung V_2 (561 nm)	0,8 V
Belichtungszeit τ_{Bel}	50 ms
Dreieckspannung an Galvospiegel V_{Galvo}	200 mV
Spannungsfrequenz an Galvospiegel f_{Galvo}	40 Hz
Anzahl der Bildstapel N_{Stapel}	360
Ebenen pro Stapel N_{Ebenen}	51
PIFOC-Schrittweite Δz	2 μm
Zeitlicher Abstand zweier Stapel ΔT	30 s

Tabelle 2.1.: Typische Aufnahmeparameter für Langzeitaufnahmen mit dem SPIM. Die Werte gelten für Aufnahmen der Linie OD95. Bei den anderen beiden benutzten Linien betrug die Spannung am AOTF (491 nm) jeweils 0,8 V. Außerdem war der bei Linie OD58 $\Delta z = 1 \mu\text{m}$ und $\Delta T = 60 \text{s}$.

bryo wird mit dem Probenhalter in die mit Reinstwasser oder M9-Puffer gefüllte Probenkammer eingebracht. Die Probekammer wird dabei etwa eine halbe Stunde zuvor auf die gewünschte Temperatur eingestellt, so dass sich ein geregeltes Temperaturgleichgewicht einstellen kann. Nun kann die Probe im Livemodus der Kamera durch Verfahren der Linearverschiebetische gesucht werden, wobei die Auflichtlampe zur Beleuchtung benutzt wird. Die aufgezeichneten Linien bieten hier Orientierung und verkürzen diesen Vorgang stark. Nachdem die mittlere Schicht des Embryos mittig in dem Kamerabild positioniert ist, wird die Auflichtlampe ausgeschaltet und die Aufnahme gestartet.

Typische Aufnahmeparameter (Linie OD95) sind in Tabelle 2.1 gesammelt (siehe auch Kap. 1.2.2). Bei den Linien XA3501 und OD95 liegt der Fokus auf einer hohen zeitlichen Auflösung, um z.B. Zellteilungszeitpunkte möglichst genau auslesen zu können. Daher wurde hier alle $\Delta T = 30 \text{s}$ ein Bildstapel aufgenommen. Um das Bleichen der Probe gering zu halten, wurde dafür die Probenverschiebung Δz zwischen zwei Einzelaufnahmen relativ groß, 2 μm , gewählt. Dafür mussten für einen vollen Stapel 51 Ebenen aufgenommen werden. Bei der Linie OD58, die ausschließlich zur Bestimmung der Zellvolumina benutzt wurde, spielt die zeitliche Auflösung weniger eine Rolle als die örtliche. Daher wurde hier Δz auf 1 μm reduziert. Um den zusätzlichen Lichteintrag aufgrund der nun nötigen 101 Ebenen pro Stapel zu kompensieren, wurde nur ein Stapel je Minute aufgenommen. Die Achse des Piezopositionierers, der zur Probenverschiebung verwendet wird, schließt mit der optischen Achse des Detektionsobjektivs einen Winkel von 45° ein. Somit ist der Abstand der einzelnen zweidimensionalen Ebenen im Objektraum $l_z = \Delta z / \sqrt{2}$.

Die Gesamtaufnahmedauer betrug bei den meisten untersuchten Embryonen $N_{Stapel} \cdot \Delta T = 3 \text{h}$, während der insgesamt $2N_{Stapel} = 720$ Bildstapel aufgenommen wurden (zwei Kanäle). Es wurde stichprobenartig überprüft, ob die untersuchten Embryonen schlüpfen. Für alle Embryonen, bei welchen dieses geprüft wurde, konnte ein Schlüpfen zum erwarteten Zeitpunkt festgestellt werden. Daraus folgt, dass die Bildaufnahme keinen signifikanten schädlichen Einfluss auf die Entwicklung hat (z.B. durch Phototoxizität).

2.1.3. Temperaturkontrolle

Das gegenwärtige SPIM-Setup ist mit einer flüssigkeitsgefüllten Probenkammer ausgestattet, die mittels eines Peltier-Elementes geheizt werden kann. Dies hat zur Folge, dass nur Temperaturen, die über der Raumtemperatur liegen, stabil kontrolliert werden können. Im vorliegenden Fall entspricht dies Temperaturen $\gtrsim 20^\circ\text{C}$.

Um Langzeitaufnahmen auch bei tieferen Temperaturen durchführen zu können, wurde eine Behelfslösung entwickelt. Hierdurch können Temperaturen ab 10°C stabil gehalten werden.

Neben der Probenkammer wird hierzu ein mit Eiswasser gefüllter Behälter auf einer erhöhten Position (z.B. einer Styroporkiste) aufgestellt. Der Behälter wird nun mittels eines Infusionsschlauchs mit Durchflussregler mit der Probenkammer verbunden. Durch die erhöhte Position stellt sich ein konstanter Fluss kalten Wassers ($\lesssim 8^\circ\text{C}$) in die Probenkammer ein (Heberprinzip). Ein zweiter Infusionsschlauch führt das überschüssige Wasser in einen Behälter unterhalb des Tisches, ebenfalls unter Ausnutzung des Heberprinzips, ab.

Um den Wasserspiegel in der Probenkammer möglichst konstant zu halten, müssen die Durchflüsse beider Schläuche aufeinander abgestimmt werden. Bei hinreichend guter Abstimmung muss nur etwa ein bis zwei Mal pro Stunde manuell nachgeregelt werden, z.B. durch temporäres Abklemmen eines Schlauches.

Der konstante Zufluss kalten Wassers führt zu einer permanenten, unspezifischen Reduktion der Wassertemperatur. Diese wird durch das geregelte Heizen des Peltier-Elementes kompensiert, so dass effektiv wieder eine konstante Temperatur erreicht wird. Bei einer geeigneten Flussrate (etwa $0,3\text{l/h}$) können so Temperaturen deutlich unterhalb der Raumtemperatur erreicht werden, wobei Schwankungen nur unwesentlich steigen und im Bereich $\pm 0,3^\circ\text{C}$ liegen (nur Heizung: $\pm 0,1^\circ\text{C}$).

2.1.4. RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) wird benutzt, um einen Knockdown, d.h. die gezielte Ausschaltung, eines bestimmten Gens herbeizuführen. Eine einfache Möglichkeit, RNAi in *C. elegans* herbeizuführen ist das Füttern gentechnisch veränderter Bakterien. Diese Bakterien müssen die zur auszuschaltenden Gensequenz gehörende dsRNA exprimieren. In der Nachkommenschaft der so gefütterten Würmer ist als Folge das betreffende Gen mehr oder weniger vollständig ausgeschaltet. Die hier verwendeten Bakterien wurden freundlicherweise von Dr. Sivan Henis-Korenblit (Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel) zur Verfügung gestellt.

RNAi-Experimente wurden nach Standardprotokollen durchgeführt, die z.B. in [93] ausführlich dargestellt sind. Auf die für diese Experimente verwendeten NGM-Platten muss vor der Verwendung IPTG und Ampicillin (alternativ Carbenicillin) aufgebracht werden. Die dsRNA exprimierenden Bakterien sind zusätzlich mit einer Immunität hiergegen versehen. Durch dieses Vorgehen wird sichergestellt, dass nur die gewünschten Bakterien und keine Fremdkolonien auf der NGM-Platte wachsen.

Es hat sich gezeigt, dass Ampicillin relativ schnell zerfällt und an Wirkung verliert. Daher wurde vom Standardprotokoll [93] insofern abgewichen, als Ampicillin und IPTG erst kurz vor dem Aussähen der Bakterien auf die Platte aufgebracht wurde (und nicht beim Gießen der Platte). Hierbei wurden jeweils $20\ \mu\text{l}$ gebrauchsfertiger IPTG-Lösung (Sigma-Aldrich) und Ampicillin (wässrige Lösung, $50\ \text{mg/ml}$, Sigma-Aldrich) ausplattiert.

Nachdem die entsprechenden Bakterienkulturen auf den Platten ausgesät und für 24 h inkubiert wurden, wurden etwa 10 L3-Larven einzeln auf jede Platte aufgebracht. Am

nächsten Tag waren diese Würmer adult und trächtig. Das weitere Vorgehen entsprach dann dem oben beschriebenen Protokoll zur Probenpräparation.

Beim Umsetzen der Würmer wird immer etwas OP50-Kultur mit übertragen. Dies kann als Test für die Wirkung des Ampicillin herangezogen werden. Etwickelt sich die OP50-Kultur, so ist das Ampicillin nicht mehr wirksam und die Platte sollte verworfen werden.

2.1.5. Entfernung der Chitinhülle

Die Entfernung der starren Chitinhülle ist mittlerweile eine etablierte Technik, siehe z.B. [58, 61, 94–96]. Aufgrund der besonderen Probeneinbringung in das SPIM, bei der das Deckgläschen in ein flüssigkeitsgefülltes Becken eingetaucht wird, mussten einige Anpassungen an den üblicherweise verwendeten Protokollen vorgenommen werden. Bei dem Einbringen wird das Deckgläschen von oben in die Flüssigkeit eingetaucht, wobei sich aufgrund der Oberflächenspannung Menisken bilden. Beim weiteren Eintauchen kollabieren diese Menisken, so dass auf der Oberfläche des Deckgläschens kurzzeitig signifikante Strömungen auftreten, die den Embryo wegzuspülen drohen. Während dies normalerweise durch eine Poly-L-Lysin-Beschichtung verhindert wird, war dies hier nicht möglich (siehe unten).

Die Chitinase zur enzymatischen Auflösung der Eihülle muss vor den eigentlichen Experimenten vorbereitet werden. Es wurde Chitinase von *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) verwendet. Diese wird mit einer Konzentration von 2,5 u/ml in *sterile egg buffer* (25 nM HEPES pH 7,3, 118 nM NaCl, 48 nM KCl, 2 nM CaCl₂, 2 nM MgCl₂, siehe [97]) gelöst. Vor der Verwendung muss die Lösung filtriert werden, wozu auf Spritzen gesteckte Vorfilter verwendet wurden. Die Lösung kann dann bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert werden.

Eier werden wie oben beschrieben aus trächtigen Wümmern heraus seziiert. Geeignete Eier verfügen über bereits sichtbare, aber noch getrennte Pronuklei. Die Sichtbarkeit der Pronuklei dient hierbei als Indikator, dass die Eihülle bereits vollständig ausgebildet ist. Embryonen vor diesem Stadium sind zu empfindlich und überleben die Behandlung i.A. nicht.

Ein geeignetes Ei wird auf ein separates Deckgläschen umgesetzt. Im Gegensatz zu anderen Protokollen findet die komplette folgende Behandlung auf diesem Deckgläschen statt, ohne den Embryo umzusetzen. Stattdessen werden die Reagenzien nacheinander vorsichtig auf das Deckgläschen pipettiert, so dass der Embryo darin eintaucht. Vor dem Aufbringen des nächsten Reagenz muss das vorherige vorsichtig und so vollständig wie möglich abpipettiert werden. Flussraten müssen dabei klein gehalten werden, so dass der Embryo an Ort und Stelle liegen bleibt. Es ist außerdem bei jedem Schritt darauf zu achten, dass der Embryo direkt auf dem Deckgläschen liegen bleibt und nicht an die Oberfläche der Flüssigkeitstropfen getragen wird, da dies beinahe irreversibel und der Embryo damit verloren ist.

Zuerst wird auf den Embryo ein 50 µl-Tropfen 3%-Lösung NaOCl (Natriumhypochlorit) aufgebracht und für 2 min dort belassen. Die Lösung wird für jeden Embryo frisch vorbereitet. Anschließend wird der Embryo drei mal mit M9-Puffer gewaschen, um die NaOCl-Lösung vollständig zu entfernen. Danach werden ~30 µl Chitinaselösung aufgebracht. Während die Chitinase einwirkt, wird der Embryo unter dem Seziernmikroskop beobachtet. Sobald die Eihülle nicht mehr erkennbar ist und die Zellen sich abzurunden beginnen, wird die Probe vorsichtig in das SPIM eingebracht. Typische Einwirkzeiten der Chitinase sind (10 - 15)min.

Das Einbringen der Probe in das SPIM hat sich wie bereits geschildert als problematisch erwiesen. Embryonen ohne Eihülle scheinen nur schlecht auf Poly-L-Lysin zu adhe-

rieren. Zudem wird Poly-L-Lysin von Natriumhypochlorit angegriffen bzw. gelöst. Auch ein Transfer des Embryos mit bereits entfernter Eihülle auf ein Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckgläschen konnte nicht stabil erfolgen, da der nun mechanisch sehr empfindliche Embryo während des Transfers oft verloren ging oder beschädigt wurde. Es hat sich allerdings gezeigt, dass der eihüllenlose Embryo von alleine hinreichend stark auf dem Deckgläschen adhäriert, wenn dieses vorher nicht gereinigt wird. Hierzu darf der Embryo längere Zeit nicht bewegt werden, was während der Einwirkzeit der Chitinase gegeben ist. Durch induzierte leichte Strömungen in dem Chitinasetropfen kann getestet werden, ob der Embryo bereits adhäriert. Hierzu wird mittels einer Pipette über dem Tropfen ein Luftzug erzeugt.

Neben der starren Eihülle aus Chitin sind die Embryonen noch von der weniger rigiden EEM/Vitellinschicht umgeben. Diese wurde bei den Experimenten nicht entfernt und wirkt als nicht-permeable Membran. Somit ist eine Kontrolle der Osmolarität der Probenkammerflüssigkeit nicht nötig. Die Probenkammer wurde bei den Experimenten entweder mit M9-Puffer oder Reinstwasser gefüllt, ein Unterschied in der Entwicklung der Embryonen konnte nicht festgestellt werden.

2.2. Datenanalyse

Die gesamte Nachbearbeitung und Auswertung der SPIM-Bilder erfolgt mittels Matlab (Versionen R2015b und später R2017b) und selbst implementierten Skripten. Für die Konversion der Rohdaten in korrekt ausgerichtete Bildstapel, die Charakterisierung der optischen Eigenschaften des SPIM sowie zur Darstellung der dreidimensionalen Bildstapel wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors ein Programmpaket (*SPIMpac*) erstellt. Daran wurden während dieser Arbeit nur kleinere Änderungen vorgenommen (z.B. die Erweiterung um einen zweiten Farbkanal). Daher wird hier auf eine detaillierte Besprechung verzichtet und auf die Diplomarbeit verwiesen [1].

Das folgende Kapitel konzentriert sich auf die zur Quantifizierung der Bildinhalte und groben Weiterverarbeitung verwendeten Algorithmen. Primär geschieht dies durch Bestimmung der zeitabhängigen Nukleuspositionen (*Tracking*), der räumlichen Ausdehnung der Zellen (*Membransegmentierung*) sowie der Nukleusgrößen. Während das Tracking von Zellkernen auch von anderen Gruppen eine oft verwendete Methode ist, nimmt die Segmentierung der Zellmembranen anhand von Bildern membranmarkierter Embryonen in dieser Arbeit eine Sonderstellung ein. Mittels dieses Algorithmus ist eine genaue und annahmefreie Bestimmung der Zellvolumina (und -formen) innerhalb der gebotenen räumlichen Auflösung der Bilder erstmals möglich und erlaubt somit deutlich präzisere Erkenntnisse über die Abhängigkeit zwischen entwicklungsbiologischen Vorgängen und Zellgrößen als zuvor.

2.2.1. Tracking der Zellnuklei

Unter *Tracking* wird die räumlich und zeitlich aufgelöste Verfolgung bestimmter Strukturen verstanden, in diesem Fall die der Zellkerne. In der vorliegenden Arbeit wird sich weitestgehend auf die frühe Embryogenese, also Zustände mit wenigen Zellen (weniger als 50) beschränkt. Insofern müssen an die Genauigkeit des Trackings hohe Ansprüche gestellt werden, falsch-positive oder falsch-negative Detektionen können ebenso wie Fehlzugeisungen nicht akzeptiert werden. Es gilt daher, ein fehlerfreies Tracking zu fordern.

Dieses Kapitel behandelt zuerst bisherige Ansätze, bevor der verwendete Algorithmus vorgestellt wird. Danach werden die nötigen Schritte zur Weiterverarbeitung und Nutzbarmachung der primären Trackingergebnisse erläutert sowie die Ergebnisse diskutiert.

Bisherige Ansätze zum Zellkerntracking in *C. elegans*

In vergleichbaren Arbeiten wird heutzutage meist das Programm *Starrynite* von Bao *et al.* zum tracken der Zellkerne verwendet [98, 99]. Entwickelt wurde es für die Evaluation konfokaler, dreidimensionaler Aufnahmen sich entwickelnder *C. elegans* Embryonen mit fluoreszent markierten Histonen. Das Programm ist in der Lage die Entwicklung eines Embryos vom vierzelligen bis zum 350-zelligen Zustand innerhalb von 25 min zu tracken und daraus automatisiert einen Abstammungsbaum (*lineagetree*) aller Zellen zu erstellen. Die Zuordnungsgenauigkeit des Trackings bei < 200 Zellen liegt bei etwa 99%. Fehler können mit einem weiteren Programm, *Acetree*, korrigiert werden [99, 100].

Starrynite benutzt effektiv ein mittelwertgefiltertes Bild zur Detektion von Intensitätsmaxima. Diese Maxima werden als Nuklei interpretiert, wenn sie zu anderen Maxima einen bestimmten Mindestabstand haben. Der Mindestabstand wird aus der erwarteten mittleren Nukleusgröße abgeschätzt, wobei diese in vorher behandelten Bildstapeln (unter der Annahme sphärischer Zellkerne) extrahiert und laufend aktualisiert wird. Die Zuordnung der gefundenen Nuklei in aufeinander folgenden Bildern erfolgt bei *Starrynite* anhand kürzester Abstände. Die Bildaufnahmerate muss daher hoch genug sein, so dass sich die Zellkerne zwischen zwei Bildern nur wenig bewegen.

In der Diplomarbeit des Autors wurde ausschließlich die Linie XA3501 verwendet. Hier liegt neben einer fluoreszenten GFP-Markierung der Histone auch eine Markierung an Tubulin, ebenfalls mit GFP vor. Aus diesem Grund erscheinen Nuklei v.a. während der Mitose nicht als sphärisch, sondern deutlich elongiert (siehe z.B. Abb. 2.1a). Außerdem verfügt das SPIM wegen der endlichen Lichtblattdicke in Kombination mit der Weitfelddetektion über eine schlechtere z -Auflösung als konfokale Mikroskope, so dass die Nuklei auch in z -Richtung elongierter als bei konfokalen Aufnahmen erscheinen. Daher lieferte *Starrynite* keine verlässlichen Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde ein deutlich reduzierter Trackingalgorithmus entwickelt, der Zellen nur anhand von Intensitätsmaxima detektiert [1, 2]. Die Zuordnung von Zellen in aufeinander folgenden Bildern erfolgt auch hier mittels eines Kriteriums kürzester Abstände. Um falsch-positive Detektionen zu unterbinden, werden alle vor dem letzten Bildstapel endenden Trajektorien gelöscht. Da mit dem Algorithmus typischerweise nur die frühen Stadien der Entwicklung untersucht werden sollten, in welchen Apoptose noch nicht auftritt, ist dies ein effektiver Weg um zu verlässlichen Ergebnissen ohne falsch-positive Detektionen zu gelangen. Mit diesem Algorithmus wurden Zustände mit $\lesssim 24$ Zellen getrackt.

Trackingalgorithmus

In dieser Arbeit wird eine weiterentwickelte Version des während der vorangegangenen Diplomarbeit entworfenen Algorithmus verwendet, sowie um ein Programm zur Fehlerkorrektur ergänzt (siehe unten). Sowohl das Tracking als auch die Fehlerkorrektur werden in eigens dafür erstellten Matlab-GUIs initialisiert bzw. ausgeführt. Das Tracking unterscheidet sich für die Linien OD95 und XA3501 nicht grundsätzlich. Aufgrund der in Linie XA3501 ebenfalls markierten Mikrotubuli ist dort allerdings der Korrekturaufwand etwas höher.

Der Trackingalgorithmus gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Abschnitt, der Segmentierung, werden alle Bildstapel sequenziell bearbeitet. Dabei werden für jeden Stapel sowohl die Koordinaten der Zellnuklei als auch der Schwerpunkt des gesamten Embryos ermittelt. Der Schwerpunkt des Embryos muss für eine Driftkorrektur bestimmt werden. Der zweite Teil ist das eigentliche Tracking, d.h. die Erzeugung zeitlich aufgelöster Trajektorien aus den einzelnen Segmentierungsergebnissen.

Der Algorithmus benötigt einige Parameter, die vom Nutzer spezifiziert werden müssen (siehe unten). Die Bestimmung passender (Schwell-) Werte erfolgt mittels des Darstellungsprogrammes *Orthoslices* (siehe [1]).

Zur Bestimmung des Ei-Schwerpunktes wird der gesamte aktuell behandelte Bildstapel mit einem für alle Stapel konstanten Schwellwert q_1 binarisiert. Der Schwellwert sollte so niedrig sein, dass ihn *alle* Voxel innerhalb des Embryos übersteigen. In diesem Fall werden auch viele Voxel außerhalb des Embryos Intensitäten oberhalb des Schwellwertes besitzen. Diese werden daher durch die Anwendung eines Öffnungsfilters (Erosion mit anschließender Dilatation, die Filtergröße beträgt $15 \times 15 \times 3$ Voxel) entfernt, wodurch der Embryo effektiv freigestellt wird. Von der so entstandenen Region wird der Schwerpunkt berechnet und als Schwerpunkt des Embryos verwendet. Für den Fall, dass nach der Öffnung des Bildes mehrere Regionen existieren, wird nur die Größte verwendet. Die Schwerpunktbestimmung bei Aufnahmen der Linie XA3501 erfolgt anhand des Nukleikanals, während sich bei Aufnahmen der Linie OD95 der Membrankanal als stabiler erwiesen hat, da er über eine höhere cytoplasmische Intensität als der Nukleikanal verfügt.

Zur Bestimmung der Zellkernpositionen wird der (unbearbeitete) Bildstapel zuerst mit einem Mittelwertfilter der Größe $8 \times 8 \times 3$ Voxel geglättet, wodurch Intensitätsmaxima näher in die geometrische Mitte der Zellkerne geschoben werden. Danach werden alle lokalen Intensitätsmaxima (bezüglich einer 26-Nachbarschaft) gesucht. Alle Voxel, die kein lokales Intensitätsmaximum sind, werden auf Null gesetzt. Zudem werden alle Voxel auf Null gesetzt, deren Intensität unterhalb eines Schwellwertes q_2 liegt. Um ein Bleichen der Probe zu kompensieren, können für q_2 beim Programmstart für alle Bildstapel unterschiedliche Werte definiert werden. Normalerweise genügt es, q_2 alle ~ 50 Bildstapel etwas zu erniedrigen, abhängig von der Aufnahmequalität und der Bleichrate.

In einem weiteren Schritt werden alle verbleibenden Maxima $i = 1 \dots n$ sequenziell weiterverarbeitet. Das Intensitätsmaximum eines Zellkerns liegt nicht notwendigerweise im geometrischen Schwerpunkt desselben. Dies gilt insbesondere während der Prophase, während der kondensierte Chromosomen räumlich voneinander getrennt vorliegen. Daher ist in diesem Schritt eine Bestimmung des Nukleusschwerpunktes notwendig. Hierfür wird das gesamte Bild mittels eines Schwellwertes $q_{3,i} = f \cdot I_i$ binarisiert. Dabei ist I_i die Intensität des i -ten Maximums und f ein festgelegter, konstanter Faktor. Bei der Binarisierung entstehen typischerweise mehrere Regionen. Der geometrische Schwerpunkt derjenigen Region, die das i -te Intensitätsmaximum enthält, wird als neue Zellkernkoordinate (“Detektion”) verwendet. Bei geeigneter Wahl von f wird hierdurch der Zellkern als Ganzes identifiziert, wodurch die Genauigkeit der Positionsbestimmung gesteigert wird. Typische Werte von f liegen im Bereich (0,8 - 0,95) und hängen von der Aufnahmequalität ab. Zu niedrige Werte können unter Umständen dazu führen, dass zwei Nuklei zu einer Region verschmelzen und daher falsch-negative Detektionen auftreten. Der gemeinsame Schwerpunkt beider Kerne wird in diesem Fall als einzelner Kern interpretiert.

Nachdem alle Bildstapel sequenziell segmentiert wurden, folgt in einem zweiten Teil die Verbindung aller Detektionen zu zusammenhängenden Trajektorien. Als Entscheidungskriterium wird hier der kleinste euklidische Abstand der Detektionen in aufeinanderfolgenden Bildstapeln verwendet. An dieser Stelle müssen daher Voxelkoordinaten in Objektraumkoordinaten umgerechnet werden, was mittels der Voxelabmessungen $l_{x,y,z}$ möglich ist. Für alle $i = 1 \dots n_t$ Zellkernkoordinaten $\mathbf{r}_{i,t}$ zur Zeit t wird der Abstand zu allen $j = 1 \dots n_{t-\Delta t}$ Koordinaten $\mathbf{r}_{j,t-\Delta t}$ zum Zeitpunkt $t - \Delta t$ (also dem vorherigen Stapel) berechnet. Die Detektion j mit dem jeweils kleinsten Abstand wird als “Mutter” der Detektion i definiert. Hierdurch werden Zellteilungen implizit erkannt und müssen nicht gesondert behandelt

werden. Nachdem alle Trajektorien erstellt wurden, werden diejenigen gelöscht, die vor dem letzten Bildstapel enden (siehe Diskussion).

Nachdem das Tracking beendet ist, werden die Ergebnisse in zwei Varianten abgespeichert, wobei die erste Version alle unbereinigten Trajektorien enthält, also auch solche, die vor dem letzten Stapel enden. Die zweite Version enthält nur vollständige Trajektorien. Es werden generell alle Koordinaten als reine Pixelkoordinaten abgespeichert (Zellkerne und Schwerpunkt des Embryos). Hierdurch können die Trajektorien den Bildern zur Darstellung und zur Korrektur (siehe unten) überlagert werden. Bevor die Trajektorien quantitativ ausgewertet werden muss daher eine Transformation in den Objektraum mittels der Voxelabmessungen $l_{x,y,z}$ erfolgen. Zudem werden die Zellkernkoordinaten dabei immer auf den Schwerpunkt des Embryos bezogen.

Fehlerkorrektur

Unter bestimmten Umständen arbeitet der Algorithmus nicht optimal und die Ergebnisse müssen manuell korrigiert werden. Es treten im Wesentlichen drei Arten zu korrigierender Probleme auf. Dies sind zum einen Positionsungenauigkeiten, die vor allem während der Prophase früher Zellen eine Rolle spielen. Des Weiteren können falsch-negative Detektionen vorkommen, bei denen ein Zellkern nicht als solcher erkannt wird. Durch eine hinreichend niedrige Wahl des Schwellwertes q_2 können solche Fehlklassifikationen nahezu vollständig vermieden werden. Das häufigste Problem ist, dass zwei oder mehrere Zellkerne in den Bildern "verschmieren" und als eine große helle Region erscheinen. In diesem Fall wird deren gemeinsamer Schwerpunkt als Zellkernposition interpretiert. Falsch-positive Fehler treten zwar auf, spielen aber wegen der Trajektorienbereinigung keine Rolle.

Aus diesen Gründen wurde ein Programm zur manuellen Korrektur der Trajektorien auf Basis des Darstellungsprogrammes *Orthosclices* (siehe [1]) erstellt. Als Eingabedatei dient der unbereinigte Trajektoriensatz (siehe oben). In dem Programm werden Maximumintensitätsprojektionen der xy -, xz - und yz -Ebenen angezeigt und die getrackten Zellkernpositionen überlagert. Zudem wird für jeden Zellkern dessen Trajektorie in den letzten zehn Bildstapeln eingezeichnet.

Nun können sequenziell alle Bildstapel analysiert werden. Im Falle von Fehlern können neue Detektionen an beliebigen Positionen hinzugefügt oder bestehende entfernt werden. Die Eingabe erfolgt über ein Fadenkreuz in allen drei Projektionen, das die aktuell ausgewählte Koordinate anzeigt. Ist die gewünschte Position markiert, kann durch die Betätigung eines Schalters eine Detektion an dieser Stelle hinzugefügt werden. Ein anderer Schalter dient zum Entfernen der dem Fadenkreuz nächsten Detektion. Nach jeder Eingabe werden die Zellkerntrajektorien wie oben beschrieben komplett neu erstellt. Wird dabei eine Detektion des Trackingalgorithmus durch eine neue Eingabe obsolet, so wird diese bei der Trajektorienbereinigung automatisch entfernt. Die korrigierten Ergebnisse werden in einer dritten Datei abgespeichert.

Weiterverarbeitung der Ergebnisse

Um die Trajektorien auszuwerten, wird aus den Trackingergebnissen immer eine Koordinatenmatrix `Coordinates` erstellt. Diese hat die Größe $N \times 44 \times 3$, wobei die erste Dimension der Zeit entspricht. N ist die Anzahl der Bildstapel bis zum 44-zelligen Zustand (weiter wird die Entwicklung, falls nicht anders angegeben, nicht ausgewertet). Typische Werte für N sind (200 - 250), abhängig vom Entwicklungszustand zu Beginn der Aufnahme. Die zweite Dimension enthält unterschiedliche Zellen des Embryos, während die dritte die drei Raumdimensionen enthält.

Die in dieser Matrix gespeicherten Trajektorien sind vom ersten bis zum letzten Stapel durchgängig, d.h., alle 44 Trajektorien der final vorhandenen Zellen enthalten die Pfade aller Mutterzellen. Beginnt die Aufnahme z.B. im einzelligen Zustand, so sind alle Einträge der ersten Zeile gleich. Sobald sich die Einträge unterscheiden, fand folglich eine Zellteilung statt. Dies kann später benutzt werden, um etwa Zellzyklendauern auszulesen.

Zuordnung der Trajektorien zu Zellen

Anhand der Trackingergebnisse ist nicht direkt ersichtlich, welche Detektion welcher Zelle entspricht, da die Identität der Zellen nicht automatisch erkannt wird. Die Reihenfolge, in welcher die einzelnen Zellen in der Matrix `Coordinates` (siehe oben) kodiert sind, ist willkürlich, aber für ein gegebenes Tracking immer gleich.

Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Zuordnung bei allen Auswertungen manuell. Dies ist aufgrund der stereotypen Aussehens der Trajektorien relativ einfach möglich (siehe z.B. [2]).

Hierfür wurde eine Matlab-GUI erstellt, in der alle Trajektorien bis zum Ende des 44-zelligen Zustandes in einem dreidimensionalen Koordinatensystem eingezeichnet werden. Der Reihe nach wird nun jede der 44 Trajektorien, d.h. Spalten der Matrix `Coordinates`, farblich markiert, deren Identität bestimmt und notiert. Das Ergebnis wird in einer separaten Datei als `Name-List` gespeichert.

Somit sind die Identitäten der Zellen am Ende des Trackings bekannt. Hieraus können auch alle vorherigen Zellen durch kombinatorische Überlegungen identifiziert werden. Sind z.B. in einer Zeile von `Coordinates` die Einträge der Spalte der Zelle *ABalaaa* gleich jenen von *ABalaap*, aber sonst keinen anderen, so kann mit Sicherheit darauf geschlossen werden, dass die jeweiligen Einträge den Ort der Zelle *ABalaa* (Mutterzelle von *ABalaaa* und *ABalaap*) beschreiben, usw.

Transformation in ein Standardkoordinatensystem

Um die Zellanordnung verschiedener Embryonen miteinander oder mit Simulationsergebnissen vergleichen zu können, müssen diese vorher in ein gemeinsames Koordinatensystem übertragen werden. Dies ist nötig, da die Orientierung der Embryonen im SPIM zufällig ist. Die Transformationen werden an den `Coordinates`-Matrizen der Trackings vorgenommen.

In der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors wurde hierfür ein Ansatz gewählt, bei dem die zu vergleichenden Trajektorienansätze aneinander ausgerichtet wurden [1, 2]. Hierfür wurden die Zellkernkoordinaten an einem klar definierten Zeitpunkt, z.B. dem Anfang des sechszelligen Zustandes, ausgewählt. Anhand eines Ähnlichkeitskriteriums, in diesem Fall dem minimalen mittleren Abstand der Koordinaten, wurde sodann eine optimale Transformationsmatrix gesucht, um die Koordinaten des zweiten Embryos in das Koordinatensystem des ersten zu übertragen. Während dieser Ansatz in den meisten Fällen verlässliche Ergebnisse liefert, hat er dennoch einige Nachteile. So müssen die Trajektorien hinreichend ähnlich sein, da sonst das Ähnlichkeitskriterium falsche Transformationsmatrizen wählt. Dies ist bei ungestörten Embryonen der Fall, jedoch nicht zwingend bei solchen ohne starre Eihülle (siehe Kap. 3.1.2). Des Weiteren werden die Trajektorien anhand eines einzigen, willkürlich gewählten Zustandes aneinander ausgerichtet.

Aus den genannten Gründen wurde in dieser Arbeit ein neuer Ansatz verfolgt, bei dem die Embryonen nicht mehr aneinander, sondern anhand ihrer eigenen Körperachsen ausgerichtet werden. Dabei wurde festgelegt, dass die AP-Achse der x -Achse des neuen Koordinatensystems entsprechen soll. Der anteriore Pol liegt dabei bei negativen x -Werten. Die DV-Achse wird als z -Achse des neuen Koordinatensystems definiert (positive Werte

dorsal). Damit bleibt die LR-Achse als neue y -Achse (positive Werte rechts). Nach der Transformation aller Koordinaten liegen alle Embryonen in demselben Koordinatensystem, ohne dass ein Vergleich untereinander nötig war. Auch eine Mittlung über Zellkoordinaten mehrerer Embryonen ist somit einfach möglich.

Zur Bestimmung der AP-Achse eines Embryos aus dem Tracking werden die Zellkernpositionen eines beliebigen Zeitpunktes als Massenpunkte mit einer Einheitsmasse interpretiert. Von dieser Anordnung wird der Trägheitstensor berechnet. Es hat sich gezeigt, dass die Hauptträgheitsachse des kleinsten Hauptträgheitsmomentes der Massenpunktanordnung (bei mindestens vier Zellen) ein stabiler Indikator für die AP-Achse ist. Um Fehler zu minimieren, wird dieses Vorgehen für alle Zeitpunkte mit mindestens vier Zellen ausgeführt und über die so berechneten Achsen gemittelt. Als Ergebnis liegt ein (normierter) Vektor \mathbf{AP} vor, der die Richtung der AP-Achse im Trackingkoordinatensystem angibt. Die Orientierung des Vektors \mathbf{AP} wird so gewählt, dass er in Richtung der sich im zweizelligen Zustand später teilenden Zelle P_1 zeigt.

Um auch die LR- und DV-Achsen zu bestimmen, wird die Zellanordnung im letzten Zeitpunkt des vierzelligen Zustandes verwendet. Hier liegen alle Zellkerne in der AP-DV-Ebene [1]. Während ABa den anterioren und P_2 den posterioren Pol einnehmen, liegt ABp dorsal und EMS ventral. Folglich liegt zu diesem Zeitpunkt auch der Vektor $\mathbf{d} = \mathbf{r}_{ABp} - \mathbf{r}_{EMS}$ in der AP-DV-Ebene und zeigt näherungsweise in dorsale Richtung. Somit kann die LR-Achse gemäß $\mathbf{LR} = \mathbf{d} \times \mathbf{AP} / |\mathbf{d} \times \mathbf{AP}|$ und die DV-Achse über $\mathbf{DV} = \mathbf{LR} \times \mathbf{AP}$ berechnet werden.

Die Transformationsmatrix in das Körperachsensystem ist $\underline{M} = [\mathbf{AP} \ \mathbf{DV} \ \mathbf{LR}]$. Nachdem alle Koordinaten transformiert wurden, sind die Körperachsen des Embryos wie oben beschrieben mit den Koordinatenachsen identisch. Das hier beschriebene Vorgehen ist stabil genug, um auch bei stark gestörten Zellkerntrajektorien (z.B. in Embryos ohne Eihülle, vgl. Kap. 3.1.2) verlässliche Ergebnisse zu liefern.

Vergleich von Trajektoriensätzen mittels Korrelationskoeffizienten

Um die Ähnlichkeit bzw. die Abweichungen der Zellanordnungen in verschiedenen Trackings zu quantifizieren, werden in dieser Arbeit Korrelationskoeffizienten verwendet. Mit diesen können die Zellanordnungen zeitabhängig paarweise verglichen werden.

Zur Berechnung der Korrelationen werden die Koordinaten verwendet, die bereits in das Körperachsensystem transformiert sind. Die Koordinaten der N zur Zeit t vorhandenen Zellen eines Embryos, d.h., eine Zeile der transformierten Matrix `Coordinates`, bei welcher mehrfache Einträge entfernt werden, werden im Folgenden mit \mathbf{x}_i ($i = 1, \dots, N$) bezeichnet. Die \mathbf{x}_i sind dabei sortiert, d.h. die Identität jeder Zelle i ist bekannt und für alle untersuchten Trackings gleich. Dies ist mittels der `Name-List` möglich (siehe oben).

Sind nun zu einem korrespondierenden Zeitpunkt (siehe unten) die Koordinaten \mathbf{x}_i und \mathbf{y}_i ($i = 1, \dots, N$) zweier Embryonen (A & B) gegeben, so kann für diese Anordnungen der vektoriell adaptierte Korrelationskoeffizient gemäß

$$c = \frac{\sum_{i=1}^N (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}) \cdot (\mathbf{y}_i - \bar{\mathbf{y}})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (\mathbf{y}_i - \bar{\mathbf{y}})^2}} \quad (2.1)$$

mit $\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mathbf{x}_i$ berechnet werden. Wie für Korrelationskoeffizienten üblich liegt c zwischen 1 (vollkommen positiver linearer Zusammenhang, $\mathbf{x}_i = \mathbf{y}_i$), und -1 (antikorreliert). Für voneinander vollkommen unabhängige Zellanordnungen sollte $c \approx 0$ gelten. Dies wird weiter unten überprüft.

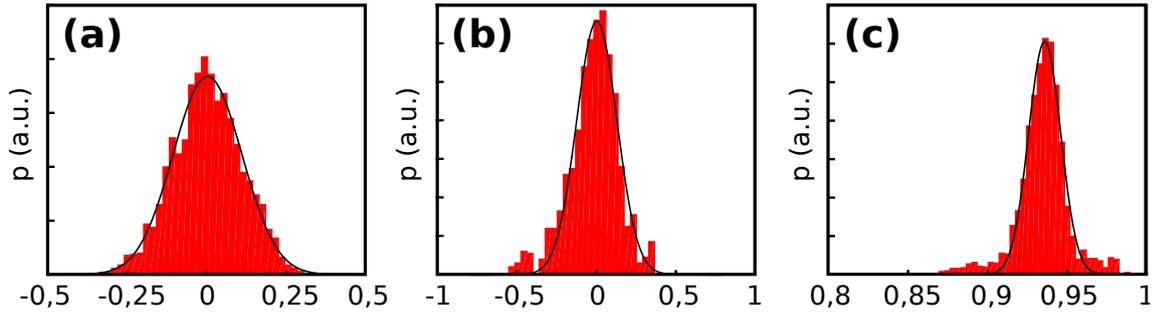


Abbildung 2.2.: Stabilitätstest der verwendeten Korrelationskoeffizienten. (a) Werden 2500 zufällig erzeugte Paare von je 24 Koordinaten gemäß Gl. 2.1 miteinander verglichen, so ergeben sich generell kleine Korrelationskoeffizienten. Deren Häufigkeitsverteilung (rote Balken) kann näherungsweise durch eine Normalverteilung beschrieben werden (schwarze Linie, Mittelwert $\langle c \rangle = -0,004$, Standardabweichung $\sigma_c = 0,16$). (b) Der paarweise Vergleich von $n = 7$ Trajektoriensätzen ungestörter Embryonen (OD95) nach Gl. 2.1, allerdings mit randomisierten Zellzuordnungen (siehe Text), liefert ebenfalls kleine Korrelationen (rote Balken), die näherungsweise normalverteilt sind (schwarze Linie, $\langle c \rangle = -0,01$, $\sigma_c = 0,18$) (c) Wird ein Trajektoriensatz künstlich verrauscht (Positionsabweichung im Mittel $2 \mu\text{m}$) und mit sich selbst verglichen, werden hohe Korrelationen erhalten (rote Balken). Sie können durch eine Normalverteilung mit $\langle c \rangle = 0,94$ & $\sigma_c = 0,02$ annähernd beschrieben werden (schwarze Linie).

Der Zeitnullpunkt wird bei diesem Vorgehen für alle verwendeten Aufnahmen auf den Beginn des vierzelligen Zustandes gelegt (Eintritt von P_1 in die Anaphase). Eine weitere zeitliche Ausrichtung der einzelnen Datensätze aneinander findet nicht statt. Das Tracking wurde generell bis in den 44-zelligen Zustand ausgeführt. Da dieser folglich nicht notwendigerweise vollständig in den Aufnahmen enthalten ist, wird die Korrelation bis zum Ende des 24-zelligen Zustandes berechnet (der Übergang zwischen beiden Stadien findet in relativ kurzer Zeit statt). Dieser Übergang muss in beiden miteinander verglichenen Koordinatensätzen nicht notwendigerweise gleichzeitig stattfinden, da die Zellteilungszeitpunkte einer gewissen Schwankung unterworfen sind (siehe Kap. 3.5). Daher wird die Korrelation nicht weiter berechnet, sobald einer der beiden Embryonen den 24-zelligen Zustand verlässt.

Aus dem selben Grund kann es vorkommen, dass eine Zelle sich zu einer Zeit t in Embryo A schon geteilt hat und in Embryo B noch nicht (oder umgekehrt). In diesem Fall werden in Gl. 2.1 die beiden neuen Tochterzellen in A jeweils mit der (gleichen) Mutterzelle in B verrechnet.

An dieser Stelle soll das verwendete Vorgehen auf seine Güte bzw. Robustheit überprüft werden. Zwei zufällig generierte Anordnungen aus jeweils N Koordinaten sollten vollständig unkorreliert sein. Für c sollte sich in diesem Fall (im Mittel) Null ergeben. Um dies zu testen, wurden 2500 Paare aus Anordnungen mit jeweils 24 Zellen zufällig erzeugt und miteinander korreliert. Die so erhaltenen Korrelationskoeffizienten folgen wie erwartet einer um Null zentrierten Verteilung, die mit hinreichender Genauigkeit durch eine Normalverteilung beschrieben werden kann (Abb. 2.2a, Mittelwert $\langle c \rangle = -0,004$, Standardabweichung $\sigma_c = 0,16$, $r^2 = 0,98$). Ein weiterer Test besteht in der Korrelation realer Zellkernanordnungen, allerdings mit randomisierten Zuordnungen, d.h., die Zuordnung der Indizes i zu den jeweiligen Zellen in Gl. 2.1 wird für jeden Embryo zufällig gewählt. Da in diesem Fall die jeweils miteinander verglichenen Positionen von unterschiedlichen Zellen stammen, sollte sich im Mittel keine Korrelation zeigen. Für diesen Test wurden $n = 7$ Trackings ungestörter Embryonen (Linie OD95, $22,5^\circ\text{C}$) verwendet. Tatsächlich folgen die Korrelationen in etwa einer um Null zentrierten Normalverteilung (Abb. 2.2b, $\langle c \rangle = -0,01$, $\sigma_c = 0,18$, $r^2 = 0,96$). Wird hingegen ein realer Trajektoriensatz mit einer verrauschten Version seiner selbst (absolute Positionsabweichungen $\Delta\mathbf{r}$ sind normalverteilt,

$\langle \Delta r \rangle = 3 \mu\text{m}$, $\sigma_{\Delta r} = 0,9 \mu\text{m}$) verglichen, so liegen die erhaltenen Korrelationskoeffizienten generell über 0,85 (Abb. 2.2c, $\langle c \rangle = 0,94$, $\sigma_c = 0,02$, $r^2 = 0,95$). Insgesamt stellen sich Korrelationskoeffizienten somit als verlässliches Maß zur Bestimmung der Ähnlichkeit zweier Zellanordnungen heraus.

Diskussion

Der hier vorgestellte Trackingalgorithmus liefert für die frühe Phasen der Embryogenese des *C. elegans* gute Ergebnisse. Im Vergleich zur früheren Version des Algorithmus [1], werden nicht nur Intensitätsmaxima zur Positionsbestimmung der Zellkerne verwendet, sondern daran anschließend eine weitere Binarisierung zur Schwerpunktbestimmung vorgenommen. Bei geeigneter Parameterwahl können hierdurch die Schwerpunkte der Zellkerne deutlich genauer bestimmt werden. Da bei der Binarisierung ein Schwellwert verwendet wird, der von der Intensität des lokalen Maximums abhängt, spielt eine Abnahme der Intensität in den tiefer gelegenen Schichten des Embryos kaum eine Rolle. Die Ungenauigkeit der Positionsbestimmung wird auf etwa $0,5 \mu\text{m}$ bis $0,7 \mu\text{m}$ (auch in z -Richtung) abgeschätzt.

Durch die dem Tracking folgende Trajektorienbereinigung, also das Löschen unvollständiger Trajektorien, stellen falsch-positive Detektionen kein Problem dar und werden effektiv entfernt. Daher kann der Schwellwert q_2 , der zur Detektion der Zellkerne verwendet wird, so niedrig gewählt werden, dass es zu einer deutlichen Übersegmentierung kommt, bei welcher viele falsch-positive Detektionen auftreten. Dies hat zu Folge, dass rein falsch-negative Fehler so gut wie nicht vorkommen.

Das größte Problem für das Tracking stellt die in z -Richtung schlechtere Auflösung dar. Hierdurch erscheinen Zellkerne in dieser Richtung elongiert. Dies kann dazu führen, dass sich zwei Zellkerne in den aufgenommenen Bildern überlagern und als eine helle Struktur ohne voneinander signifikant abgegrenzter Maxima erscheinen. In diesem Fall gibt es nur eine Detektion in der Mitte der beiden Zellkerne. Dieses Problem kann durch eine Erhöhung des Parameters f abgemildert, aber vor allem bei späteren Stadien mit vielen dicht beieinander liegenden Zellkernen nicht vollständig vermieden werden.

Alle verbleibenden Fehler werden manuell korrigiert. Im Wesentlichen müssen Fehler der letztgenannten Art behandelt werden, wobei der Aufwand stark von der Aufnahmequalität abhängt. Helle, kontrastreiche Aufnahmen benötigen nur wenig manuelles Eingreifen, während bei weniger scharfen Aufnahmen zum Teil viele Zellkernpositionen hinzugefügt werden müssen (die Bildschärfe wird z.B. von der Lage des Embryos im Lichtblatt stark beeinflusst, wobei sich die Lage durch eine Drift unkontrolliert ändern kann). Um ein Tracking bis zum 44-zelligen Zustand zu korrigieren, waren im Mittel (45 ± 20) Eingriffe nötig. Bei typischerweise etwa 4000 (korrekten) Detektionen insgesamt entspricht dies einer Korrekturrate von ca. 1%. Der Arbeitsaufwand hierfür beträgt etwa 2 Stunden.

2.2.2. Segmentierung der Zellmembranen

Unter einer Segmentierung versteht man die eindeutige Aufteilung aller Pixel/Voxel eines Bildes auf eine bestimmte Anzahl an Regionen, wobei alle Pixel/Voxel einer Region eine gewisse Eigenschaft teilen. Das Ziel im vorliegenden Fall ist es, alle Voxel eines Bildstapels eines membranmarkierten Embryos eindeutig einer Zelle oder dem Außenraum des Embryos zuzuordnen. Das Bild eines Embryos mit n Zellen soll also in $n+1$ Regionen aufgeteilt werden. Aus dem Ergebnis der Segmentierung können folglich Zellvolumina und -formen quantitativ erfasst werden. In dieser Arbeit bleibt der Fokus auf Zellvolumina beschränkt. Die Zellformen sollen in zukünftigen Projekten analysiert werden (vgl. Kap. 4.2).

In diesem Kapitel wird zuerst auf Ansätze zur Volumenbestimmung anderer Gruppen eingegangen, bevor typische Probleme bei der Segmentierung von SPIM-Bildern aufgezeigt werden. Danach wird der entwickelte Algorithmus vorgestellt und diskutiert. Abschließend wird die Stabilität der Zellvolumenbestimmung mittels der Segmentierung geprüft.

Bisherige Ansätze zur Zellvolumenbestimmung in *C. elegans*

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl an Studien, die den Einfluss der Zellvolumina auf andere Observablen während der Embryogenese von *C. elegans* behandeln [101–107]. Bei diesen Studien wurden entweder DIC- oder Fluoreszenzmikroskope verwendet. Dabei wurden in keinem Fall Zellvolumina direkt und annahmefrei gemessen. Im Folgenden soll eine Übersicht über die verwendeten Ansätze gegeben werden.

Um eine grobe Abschätzung für einzelne Zellvolumina zu erhalten wurde z.B. das gesamte embryonale Volumen gemessen und durch die Anzahl der Zellen geteilt [101, 102]. Die Messung des Gesamtvolumens ist relativ einfach möglich, da der Embryo in guter Näherung eine ellipsoide Form hat, so dass die Längenbestimmung zweier Achsen genügt. Bei diesem Ansatz werden jedoch geometrische Asymmetrien der Zellteilungen außer Acht gelassen, wodurch zum Teil große Fehler in Kauf genommen werden. So unterscheiden sich etwa die Zellvolumen innerhalb des achtzelligen Zustandes um bis zu einen Faktor 2 (bestimmt durch Messungen in dieser Arbeit, siehe Kap. 3.2.1 & Kap. 3.3).

Eine andere, oft verwendete Näherung ist die Messung der Zelldurchmesser anstelle der Volumen [103–105]. Da Zellen jedoch i.A. keine regelmäßige Form aufweisen, kann aus Durchmessern nicht ohne Weiteres auf Volumen geschlossen werden.

In ausgefeilteren Ansätzen werden dreidimensionale Bilder der Zellen verwendet und die Fläche der Zellen in drei oder mehreren Ebenen der Bildstapel manuell bestimmt. Galli *et al.* verwendeten z.B. für jede Zelle drei Ebenen und kombinierten die dort gemessenen Flächen in Prismatoiden, um auf das Zellvolumen rückschließen zu können [106]. Formabweichungen der Zellen zwischen den drei verwendeten Ebenen können allerdings zu signifikanten Fehlern führen. Arata *et al.* verwendeten DIC-Bilder und bestimmten die Zellfläche manuell in jeder Bildebene, die die Zelle enthält. Zusammen mit dem Abstand der einzelnen Ebenen kann dann auf das Zellvolumen geschlossen werden [107].

Auch wenn der letztgenannte Ansatz innerhalb der Auflösung der Aufnahme ohne Annahmen über die Zellform auskommt, ist er durch die manuelle Bestimmung der Zellflächen in den einzelnen Ebenen zu einem gewissen Grad subjektiv. Außerdem ist die Auswertung arbeitsintensiv, so dass sich die Autoren der Studie auf die Bestimmung der Zellvolumen anhand weniger Zeitpunkte beschränken mussten. Die gewonnenen Daten weisen folglich eine geringe statistische Signifikanz auf.

Probleme bei der Segmentierung

Bilder, die mit dem SPIM oder anderen Fluoreszenzmikroskopen aufgenommen werden, weisen eine Reihe von Eigenschaften auf, die eine Segmentierung erschweren: Schattenartefakte, Orientierungsabhängigkeit der Intensität sowie eine Kontrastreduktion mit der Eindringtiefe in die Probe.

Eine für Lichtblattmikroskope typische Art von Artefakten ist Schattenwurf: die Fluoreszenzintensität sinkt hinter hellen Strukturen entlang des Lichtblattes signifikant ab (siehe Abb. 2.3a). Dieser Effekt entsteht durch einen Abfall der Beleuchtungsintensität infolge von Streuung und Absorption an den hellen Strukturen [108]. Da die Intensität der Membranen stellenweise auf das Niveau der cytoplasmischen Intensität absinkt, stellen diese Artefakte ein Hindernis für eine automatisierte Detektion der Membranen dar.

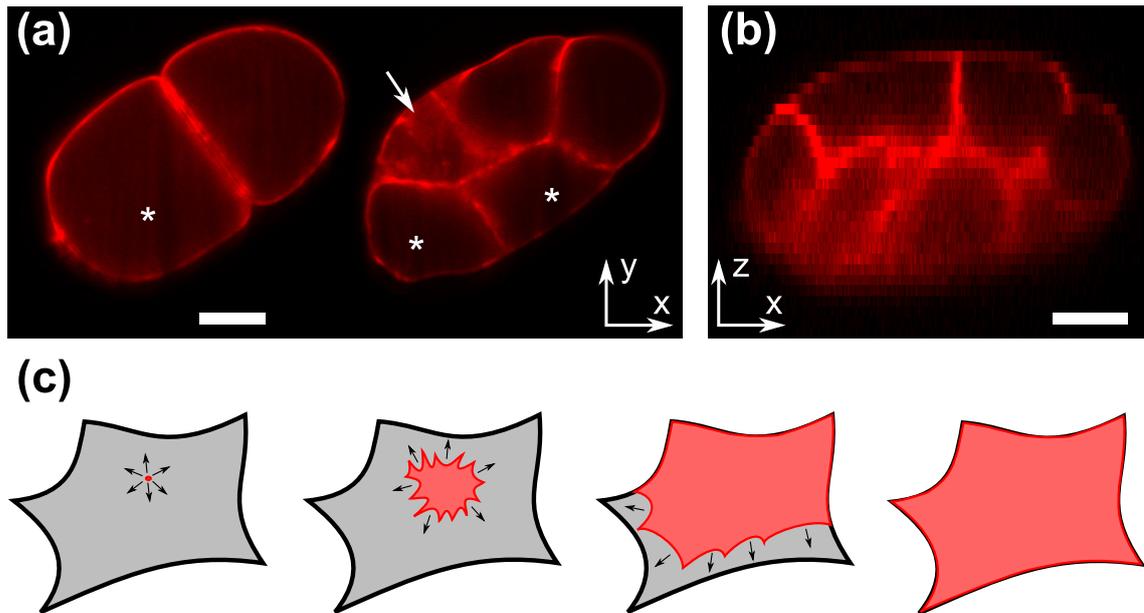


Abbildung 2.3.: Probleme und schematische Übersicht der Membransegmentierung. (a) Repräsentative xy -Ebene eines Bildstapels. SPIM-Bilder weisen oft Schattierungen hinter hellen Strukturen als Artefakte auf (Stern). Außerdem ist die Intensität einer Plasmamembran stark von deren Orientierung abhängig. Membranen, die in der Lichtblattebene liegen, erscheinen dunkler (Pfeil). (b) Repräsentative xz -Ebene eines Bildstapels. Aufgrund von Streuung und Absorption nimmt die Bildqualität nach unten hin, in weiter vom Detektionsobjektiv entfernten Gebieten der Probe, deutlich ab. Längenskala $10\ \mu\text{m}$. (c) Schematisches Prinzip des Algorithmus zur Segmentierung. In jeder Zelle wird eine sog. *seed-region* platziert (links). Diese wird lokal so lange expandiert (2. Bild von links), bis sie entweder an eine andere Region stößt oder an einem Intensitätsabfall stoppt, typischerweise an einer Zellmembran (3. Bild). Dieses Vorgehen geschieht iterativ, bis die gesamte Zelle von der Region überdeckt ist (rechts).

Ein generelles Problem ist die Abhängigkeit der Intensität der Plasmamembranen von deren Orientierung bezüglich der Beleuchtungs- und Detektionsachse. Um dies zu verdeutlichen, ist es aufschlussreich, zwei Grenzfälle zu betrachten: die Membran liegt in der Fokalebene des Detektionsobjektivs oder steht senkrecht dazu. Im ersterem Fall wird sich nur eine monomolekulare Schicht an Farbstoff in der beleuchteten Fokalebene befinden (unter Vernachlässigung des cytoplasmischen Anteils). Aufgrund der endlichen Dicke des Lichtblattes von einigen Mikrometern werden jedoch im zweiten Fall deutlich mehr Fluorophore zur detektierten Intensität in einem Pixel beitragen. Folglich erscheinen Plasmamembranen, die in der Fokalebene des Detektionsobjektivs liegen dunkler als solche, die senkrecht auf der Fokalebene stehen, siehe hierzu auch Abb. 2.3a.

Ein weiteres Problem entsteht aus der Tatsache, dass der Kontrast und die Schärfe der Bilder in tieferen Schichten des Embryos deutlich abnehmen (siehe Abb. 2.3b). Wie bei allen dreidimensional auflösenden Fluoreszenzmikroskopen muss auch bei der Lichtblattmikroskopie das von der Probe emittierte Licht die komplette darüber liegende Probendicke durchdringen, um vom Detektionsobjektiv aufgenommen werden zu können. Je mehr Strecke dabei in der Probe zurückgelegt werden muss, desto höher wird der gestreute oder re-absorbierte Anteil, der nicht mehr detektiert werden kann. Folglich nimmt die Bildqualität mit steigender Eindringtiefe in der Probe ab. Ein Segmentierungsalgorithmus sollte dennoch in der Lage sein, über die komplette Probendicke verlässliche Resultate zu liefern.

Algorithmus zur Membransegmentierung

Aufgrund der oben dargestellten Probleme ist eine Segmentierung anhand globaler Filterung und Schwellwertsetzung ohne *a priori* Wissen nicht verlässlich. Aus diesem Grund wurde ein neuer Algorithmus entworfen, der auf dem Konzept des *seeded region growing* basiert [109]: In jeder der n Zellen wird eine *seed-region* (Expansionskeim) platziert. Diese *seed-regions* werden anschließend lokal und iterativ expandiert, solange die lokale Intensität nicht abnimmt oder die Region mit einer anderen kollidiert (siehe Abb. 2.3c für eine schematische Übersicht). Der konkrete Ablauf wird im Folgenden detailliert dargestellt.

Zuerst wird der komplette Bildstapel zur Rauschverminderung mit einem Mittelwertfilter der Größe $5 \times 5 \times 1$ Voxel gefaltet. Danach wird der Hintergrund, d.h. alle Voxel außerhalb des Embryos, durch einen globalen Schwellwert auf Null gesetzt. Dies ist möglich, da PLC1 δ 1 ein peripheres Membranprotein ist, also auch einen cytoplasmischen Anteil aufweist. Hierdurch sind sowohl die Plasmamembranen als auch das Cytoplasma deutlich heller als der Hintergrund. Als nächstes wird eine *seed-region* in jeder Zelle platziert. Dies kann entweder manuell erfolgen oder automatisiert anhand der Tracking-Ergebnisse (siehe unten).

Während der eigentlichen Segmentierung werden diese *seed-regions* gleichzeitig iterativ expandiert. Hierzu werden zuerst die Grenzflächen der Regionen mittels einer Erosion berechnet. Sei F_i die zur i -ten Zelle gehörende Region ($F_i(x, y, z) = 1$ innerhalb der Region, 0 sonst), dann ist deren Grenzfläche $B_i = F_i - \text{erode}(F_i, \text{ones}(3, 3, 3))$. Voxel auf der Grenzfläche haben eine Seite, Kante oder Ecke mit dem Außenraum der Region gemein. Als nächstes wird für jedes Voxel der Grenzfläche ein Nachbarvoxel (bzgl. einer 26-Nachbarschaft) außerhalb der Region *zufällig* ausgewählt und beide Intensitäten verglichen. Falls die Intensität des Voxels außerhalb (I_{out}) größer oder vergleichbar zu der des Referenzvoxels innerhalb der Region (I_{in}) ist, $I_{out} \geq q \cdot I_{in}$, und falls das Voxel außerhalb der Region noch keiner anderen Region zugeordnet wurde, wird es der Region hinzugefügt. Der Faktor q wird eingeführt, um auch ein rauschbedingtes, geringfügiges Absinken der Intensität zu tolerieren. Der Wert von q hängt von der Aufnahmequalität ab und liegt im Bereich $q \approx 0,975 - 0,99$. Ein zu niedriger Wert von q führt zu einer Überexpansion der Regionen, da Intensitätsabfälle nicht mehr stabil erkannt werden. Ein zu hoher Wert hingegen führt zu einer nur unvollständigen Expansion, da rauschbedingte geringfügige Intensitätsunterschiede als Zellgrenze interpretiert werden. Nachdem alle Grenzflächenvoxel aller Zellen bearbeitet wurden, wird zur nächsten Iteration gesprungen.

Um die Rechenzeit möglichst kurz zu halten, werden zuerst $N = 300 / \log(n+1)$ Iterationen auf einer verkleinerten Version des Bildstapels ausgeführt. Hierzu wurde entlang jeder Dimension nur jedes zweite Voxel verwendet, so dass das Bild insgesamt nur noch $1/8$ der Voxel enthält. Nach dem Hochskalieren auf das Originalbild wurden weitere 40 Iterationen ausgeführt, um auch Details der Zellen auflösen zu können. Danach wurden kleinere Artefakte wie etwa einzelne unerkannte Voxel durch morphologische Filter (Öffnung und Schließung mit einem Filterkern der Größe $15 \times 15 \times 3$ Voxel) korrigiert.

Insgesamt führt das dargelegte Schema zu einer Expansion der *seed-regions*, bis die Regionen entweder miteinander kollidieren oder ein Abfall der zugrundeliegenden Intensität erkannt wird. Letzteres ist typischerweise an der Grenze zwischen Plasmamembran und Cytoplasma bzw. außerhalb des Embryos der Fall. Die Grenzfläche einer Region kann daher als verlässliche Darstellung der Plasmamembran einer Zelle angesehen werden (siehe auch Diskussion unten).

Die Ergebnisse werden als Bildstapel abgespeichert, wobei jeder Region eine Zahl zugewiesen wird. Jedes Voxel einer Region erhält diese Zahl als Wert (zur Zuordnung zu den jeweiligen Zellidentitäten siehe nächster Abschnitt).

Platzierung der Seeds

Wie oben beschrieben, kommt der Segmentierungsalgorithmus nicht ohne *a priori* Wissen aus, da die *seed-regions* für jeden Bildstapel festgelegt werden müssen. Dies kann entweder manuell oder automatisiert mittels des zuvor erfolgten Trackings der Zellnuklei geschehen. Bei Bildern der Linie OD58 muss ein manuelles *seeding* erfolgen, da hier nur die Plasmamembranen fluoreszent markiert sind und die Nukleipositionen unbekannt sind. Das *seeding* geschieht hier über eine für diesen Zweck erstellte Matlab-GUI. Hier wird eine *xy*-Ebene eines Bildstapels angezeigt, über einen Schieberegler kann die Ebene gewechselt werden. Die *xy*-Positionen der *seeds* werden durch Klicken an die entsprechende Stelle festgelegt, als *z*-Wert wird der Index der aktuell angezeigten Ebene verwendet. Um die aus den Segmentierungsergebnissen gewonnenen Volumen spezifischen Zellen zuordnen zu können, muss das *seeding* aller Zellen eines Bildstapels in einer vordefinierten Reihenfolge geschehen (z.B. zuerst *AB*, dann *P₁* etc). Folglich muss der auswertenden Person beim *seeding* die Identität der einzelnen vorhandenen Zellen bekannt sein. Dies setzt der maximalen Zellanzahl effektiv eine obere Schranke, da man über mehr als ~ 24 Zellen kaum den Überblick behalten kann.

Für Aufnahmen der Linie OD95 ist manuelles *seeding* nicht mehr notwendig. Hier werden die Nuklei zuerst getrackt und das Ergebnis dann als Initialisierung für die Membransegmentierung verwendet. Hierdurch entfällt die obere Grenze für die Zellanzahl und es kann auch in deutlich späteren Entwicklungsstufen noch segmentiert werden. In diesem Fall erfolgt die Zuordnung der Segmentierungsergebnisse zu einzelnen Zellidentitäten über die Trajektorien der Zellkerne (welche notwendigerweise innerhalb der segmentierten Regionen liegen, siehe auch Kap. 2.2.1).

Bei den beiden beschriebenen Vorgehen unterscheidet sich der Zeitpunkt, ab welchem eine Zelle als geteilt angesehen wird. Während bei der manuellen Segmentierung eine Zelle so lange mit nur einem *seed* initialisiert wird, bis die Cytokinese vollständig abgeschlossen ist, wird die Zelle beim automatisierten, trackingbasierten *seeding* bereits ab der Anaphase mit zwei *seeds* initialisiert. In letzterem Fall ist die Zelle physisch noch nicht geteilt, d.h. durch Plasmamembranen getrennt, so dass die Grenzen der segmentierten Regionen innerhalb der Zelle willkürlich verlaufen. Hierauf muss bei der Auswertung geachtet werden, insbesondere wenn die Zellform analysiert werden soll.

Diskussion

Mit dem oben beschriebenen Algorithmus können Bilder von membranmarkierten Embryonen in drei Dimensionen mit hoher Präzision automatisiert segmentiert werden. In Abb. 2.4a sind *xy*-Schnitte repräsentativer Bildstapel sowie die Segmentierungsergebnisse gezeigt, während in Abb. 2.4b *xz*-Schnitte dargestellt sind. Die oben angesprochenen Probleme werden dabei umgangen bzw. spielen nur eine untergeordnete Rolle für die Qualität der Ergebnisse. Hierfür war es allerdings nötig, dem Algorithmus *a priori*-Wissen in Form der *seeds* bereitzustellen.

Der Grund für die Robustheit dieses Ansatzes trotz der eingangs dargelegten Probleme liegt in der lokalen Herangehensweise: es werden immer nur die Intensitäten benachbarter Voxel verglichen, die absolute Intensität spielt damit keine Rolle. Deshalb sind die Ergebnisse in tieferen Schichten des Embryos nur unwesentlich weniger präzise als an seiner dem Detektionsobjektiv zugewandten Oberfläche, auch wenn die Bildqualität dort signifikant schlechter ist. Solange der Kontrast zwischen Cytoplasma und Membran noch ausreichend hoch ist, um mit dem gewählten *q*-Faktor erkannt zu werden, beeinflusst eine Kontrastreduktion die Ergebnisse kaum. Aus dem selben Grund spielt auch die Orientierungsab-

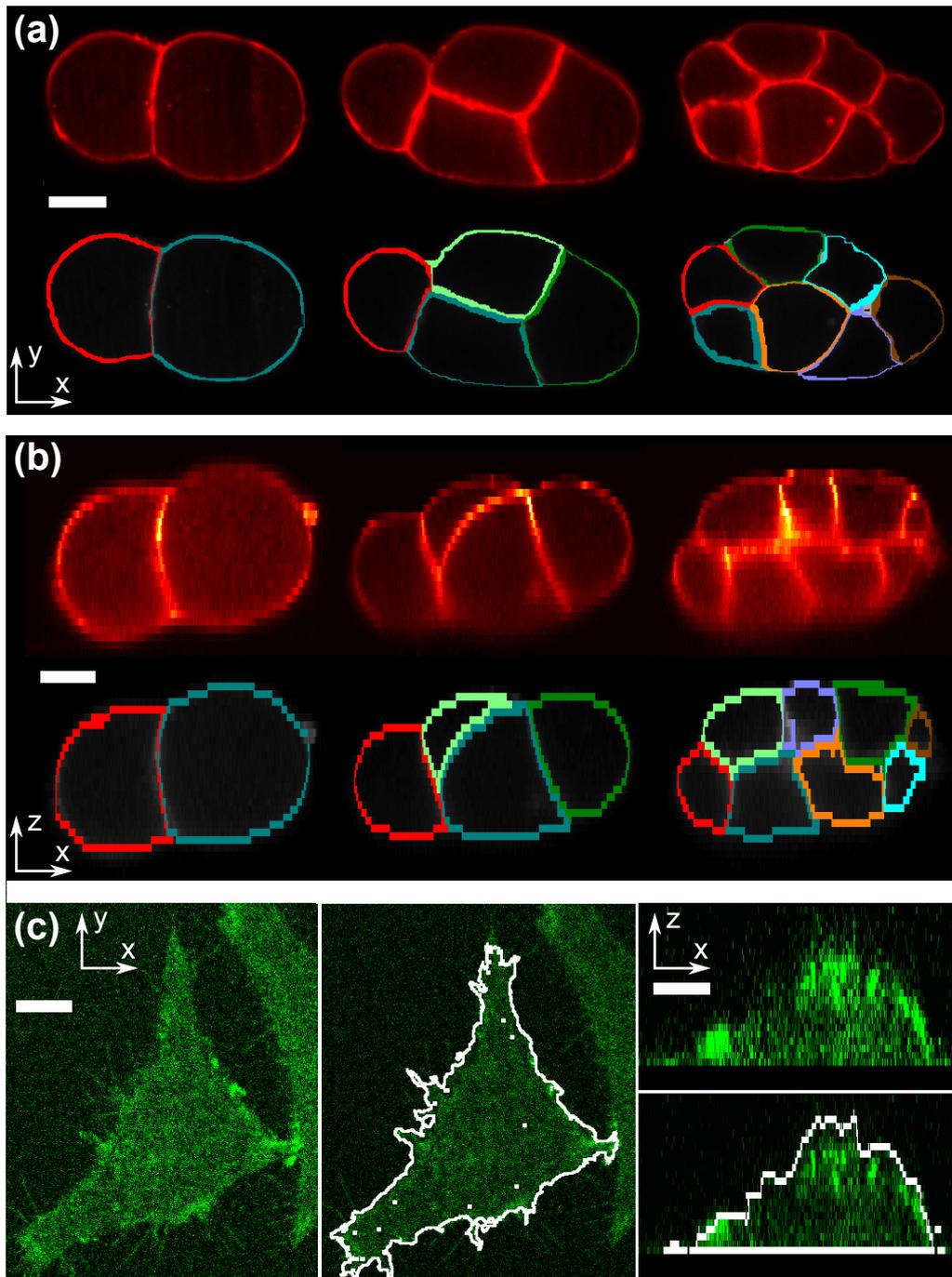


Abbildung 2.4.: Ergebnisse des Segmentierungsalgorithmus. (a) Repräsentative xy -Ebenen von Bildstapeln membranmarkierter Embryonen. In der oberen Reihe sind die Rohdaten, d.h. unsegmentierte Bilder, von Embryonen mit zwei, vier und 12 Zellen (Linie OD95) gezeigt. Die untere Reihe zeigt die Grenzflächen der segmentierten Zellen (willkürliche Farbauswahl). Längenskala $10\ \mu\text{m}$. (b) Wie (a), allerdings werden xz -Ebenen gezeigt. Zu beachten ist, dass auch in tieferen Ebenen die Plasmamembranen korrekt erkannt wurden. Längenskala $10\ \mu\text{m}$. (c) Mit dem Algorithmus können auch andere Aufnahmen segmentiert werden, wie hier am Beispiel einer Membran-markierten HeLa-Zelle (Farbstoff FM 4-64) gezeigt ist. Die Bilder stammen von einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop und wurden von Olivia Stiehl aufgenommen. Längenskala $10\ \mu\text{m}$ (gilt für die x - und y -Richtung; das Bild ist zur besseren Erkennbarkeit in z -Richtung gestreckt, die Voxelabmessung in dieser Richtung beträgt $500\ \text{nm}$).

hängigkeit der Fluoreszenzintensität kaum eine Rolle: selbst wenn eine Plasmamembran, die in der Fokalebene des Detektionsobjektivs liegt, deutlich dunkler als eine senkrecht dazu stehende erscheint, ist sie trotzdem heller als das Cytoplasma und kann somit stabil detektiert werden.

Schattenartefakte stellen das größte Problem für eine präzise Segmentierung dar. Sie können von den expandierenden Regionen überwunden werden, wenn der q -Faktor nicht zu hoch ist. Hierauf ist also bei der Parameterwahl zu achten. Die zufällige Wahl eines Nachbarvoxels zum Intensitätsvergleich sorgt zudem dafür, dass bei hinreichend vielen Iterationen alle möglichen Nachbarn getestet werden. Aufgrund des Bildrauschens steigt somit die Wahrscheinlichkeit, dass die Region den schattierten Bereich durchdringen kann. Bei einer manuellen Platzierung der *seed-regions* gibt es zudem die Möglichkeit, die *seeds* in die Mitte der schattierten Bereiche zu setzen, so dass die Intensität in alle Richtungen steigt.

Typische Rechenzeiten liegen im Bereich von etwa (3-10)min pro Bildstapel, abhängig von Bildgröße und Anzahl der Zellen. Eine gesamte Langzeitaufnahme kann daher über Nacht segmentiert werden.

Insgesamt ist es mit dem entwickelten Algorithmus in Kombination mit der Lichtblattmikroskopie erstmals näherungsweise möglich, die Zellen während der frühen Embryogenese des *C. elegans* automatisiert zu segmentieren und ihr Volumen zu bestimmen (siehe Kap. 3.2). Die Anwendbarkeit des Algorithmus ist dabei jedoch keineswegs auf die ursprüngliche Problemstellung (membranmarkierte, dreidimensionale Aufnahmen von *C. elegans* mit einem Lichtblattmikroskop) beschränkt. In Abb. 2.4c sind dreidimensionale konfokale Aufnahmen einer Kulturzelle (HeLa) gezeigt und den Segmentierungsergebnissen gegenübergestellt. Die Zelle ist mit dem Farbstoff FM 4-64 markiert. Dieser Farbstoff soll eigentlich nur die Plasmamembran färben, weist in diesem speziellen Fall jedoch eine nahezu gleich große cytoplasmische Intensität auf. Trotz der vergleichbar schlechten Aufnahmequalität liefert die Segmentierung gute Ergebnisse, sowohl in der xy -Ebene als auch senkrecht dazu.

Der Algorithmus kann daher äußerst vielfältig verwendet werden. Eine Adaption auf zweidimensionale Bilder ist trivial möglich.

2.2.3. Bestimmung der Nukleusvolumen während der Interphase

Zur Bestimmung der zeitabhängigen Nukleusvolumina wurden Bilder der Linien OD95 und XA3501 verwendet. Im Folgenden wird zuerst auf den allgemein zur Segmentierung verwendeten Ansatz eingegangen, bevor die konkreten Implementierungen für beide Linien erklärt werden. Eine ausführliche Diskussion und Validierung dieses Vorgehens findet in Kap. 3.4 statt.

Ansatz

Anders als bei der Segmentierung der Plasmamembranen ist zur Bestimmung der Nukleusvolumen ein dreidimensionaler Ansatz bei der gegebenen z -Auflösung nicht optimal geeignet. Da die Zellnuklei deutlich kleiner sind (Durchmesser (5 - 10) μm), erstrecken sie sich nur über einige wenige zweidimensionale Bildebenen, so dass hier die geringere Auflösung in z -Richtung eine relativ große Ungenauigkeit zur Folge hätte.

Der gewählte Ansatz ist daher ein zweidimensionaler: die Querschnittfläche der Nuklei entlang der z -Achse ist präzise auslesbar. Unter der Annahme, dass die Nuklei kugelförmig sind, kann aus der Querschnittfläche der Radius und folglich das Volumen errechnet werden. Diese Annahme wird mit folgender Überlegung gerechtfertigt: während der Interphase

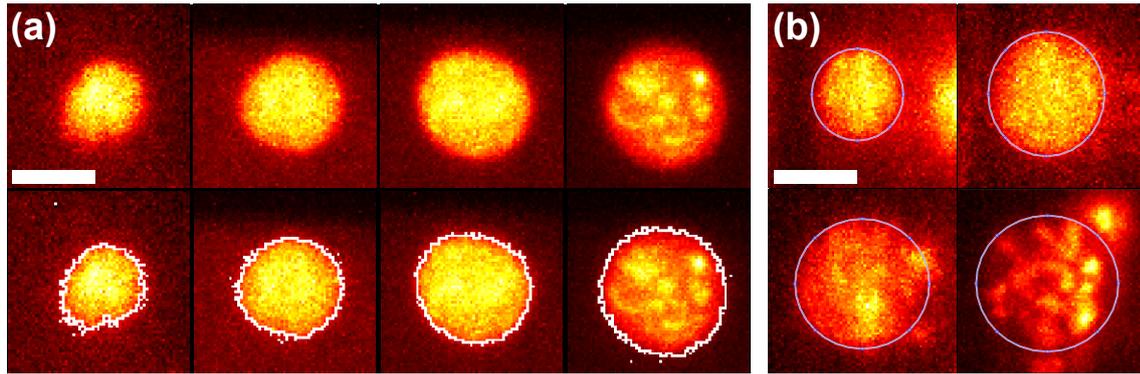


Abbildung 2.5.: Segmentierung der Zellkerne. (a) Bilder von Zellkernen der Linie OD95. In der oberen Reihe sind Maximumintensitätsprojektionen entlang der z -Achse eines Zellkerns in unterschiedlichen Stadien der Interphase dargestellt. In der unteren Reihe sind zusätzlich die Ränder der segmentierten Zellkern-Querschnittsfläche (weiß) mit eingetragen. (b) Bilder von Zellkernen der Linie XA3501. Hier sind nicht nur Histone fluoreszent markiert, sondern auch Tubulin. Daher wurden die Querschnittsflächen der Zellkerne manuell bestimmt (blaue Ellipsen). Helle Strukturen außerhalb dieser Ellipsen werden dem Spindelapparat zugeordnet. Längenskala $5 \mu\text{m}$.

erscheinen die Nuklei in Aufnahmen entlang der z -Achse immer als runde Objekte (siehe z.B. Abb. 2.5 oder Abb. 3.15). Da die Orientierung der Embryonen im SPIM, also die relative Lage der DV- und LR-Körperachse zur optischen Achse des Detektionsobjektivs, zufällig festgelegt wird, wird ein hinreichend großes Ensemble aus Embryonen von allen Seiten betrachtet. Da Nuklei entlang diesen willkürlich verteilten z -Achsen immer rund erscheinen, sind sie folglich in guter Näherung kugelförmig. Aus der Querschnittsfläche A_{qs} kann das Volumen der Nuklei gemäß $V_{nuc} = \frac{4}{3}\pi^{-1/2}A_{qs}^{3/2}$ bestimmt werden.

Segmentierung der Nuklei in Aufnahmen der Linie OD95

Die Linie OD95 verfügt über eine mCherry-Markierung der Histone. Folglich erscheinen die (während der Interphase dekontensierten) Chromosomen fluoreszent. Da in dem entsprechenden Kanal keine weitere Markierung vorliegt, bilden helle Areale der Bilder zuverlässig die Zellnuklei ab (in Kap. 3.4.2 wird verifiziert, dass die markierten Histone den Kern vollständig ausfüllen). Um die Querschnittsfläche eines gegebenen Nukleus in einem Bildstapel zu bestimmen, wurde aus dem gesamten Stapel eine Region der Größe $70 \times 70 \times 5$ Voxel, zentriert um den Schwerpunkt des Zellkerns, ausgeschnitten (siehe unten). Von dieser Region wurde anschließend entlang der z -Achse eine Maximumintensitätsprojektion (MIP) gebildet (siehe Abb. 2.5a, obere Reihe). Das Histogramm dieser MIP weist typischerweise eine bimodale Verteilung auf, wobei der Modus niedriger Intensität das Cytoplasma und der Modus höherer Intensität den Zellkern repräsentiert. Zwischen beiden Modi liegt folglich ein Minimum. Der zum Minimum gehörende Intensitätswert wird nun als Schwellwert verwendet, um das Bild zu binarisieren. In den meisten Fällen liefert dieses einfache Vorgehen bereits ein präzises Ergebnis, allerdings kommt es in manchen Aufnahmen zu Fehlern. Aus diesem Grund kann der Schwellwert manuell korrigiert werden (siehe unten). Das binarisierte Bild enthält eine große Region in der Mitte des Bildes (sollten außerhalb der zentralen Region weitere Pixel über dem Schwellwert liegen, werden diese in der folgenden Auswertung verworfen). Deren Pixelanzahl n_{qs} ist ein Maß für die Querschnittsfläche des Nukleus, die mit Hilfe der Pixelgröße gemäß $A_{qs} = n_{qs} \cdot l_x \cdot l_y = n_{qs} \cdot 0,0256 \mu\text{m}^2$ bestimmt werden kann.

Um die großen Datenmengen mit Hilfe des oben beschriebenen Algorithmus möglichst effizient auswerten zu können, wurde hierfür eine Matlab-GUI entworfen. Zum Finden und Zuordnen der Nuklei zu den Zellen benötigt diese GUI ein Tracking der Zellnuklei sowie eine **Name-List** (siehe Kap. 2.2.1). Da das Tracking typischerweise im 44-zelligen Zustand endet, können nur solche Zellen/Nuklei über ihre gesamte Zellzyklendauer ausgewertet werden, die sich vor dem Erreichen dieses Zustandes bereits geteilt haben. Dies sind die ersten fünf Generationen der *AB*-Linie, die ersten beiden Generationen der *MS*- und *C*-Linie, *EMS*, *E* sowie P_1 bis P_3 (insgesamt 42 Zellen).

In der GUI werden nun alle diese Zellen der Reihe nach analysiert. Dabei wird jeweils mit dem ersten Bildstapel, in dem sie nach erfolgter Teilung der Mutterzelle erscheinen, begonnen und alle weiteren vor ihrer eigenen Teilung sequenziell bearbeitet. Standardmäßig wird der entsprechende Bildstapel eingelesen und die um den Nukleus zentrierte Region ausgeschnitten. Als Zentrum dienen dabei die beim Tracking gefundenen Koordinaten des Nukleus. Danach wird der oben beschriebene Algorithmus ausgeführt und das Ergebnis als Überlagerung mit dem ursprünglichen Bild angezeigt (siehe Abb. 2.5a, untere Reihe). Für den Fall, dass die Nukleusfläche offensichtlich falsch erkannt wurde, kann der verwendete Schwellwert nun in 5%-Schritten der Maximalintensität erhöht oder erniedrigt werden, um den Fehler manuell zu korrigieren. Fehlerkennungen treten vor allem dann auf, wenn die Intensitätsverteilung des Cytoplasmas stark inhomogen ist. In diesem Fall funktioniert die automatische Bestimmung des Schwellwertes anhand des Histogramms nicht zuverlässig. Das Ergebnis kann entweder akzeptiert oder verworfen werden. Danach wird der nächste zu bearbeitende Bildstapel geladen.

Segmentierung der Nuklei in Aufnahmen der Linie XA3501

In der Linie XA3501 sind sowohl Histone als auch Tubulin mit GFP markiert. Neben fluoreszenten Chromosomen erscheinen somit auch die Spindelapparate als helle Strukturen (siehe Abb. 2.5b). Daher ist ein semi-automatisiertes Vorgehen wie bei Linie OD95 nicht möglich. Die Auswertung erfolgt folglich bei Bildern dieser Linie vollständig manuell. Das Grundprinzip, die Bestimmung der Querschnittfläche unter der Annahme sphärischer Nuklei, bleibt dabei erhalten.

Für jede auszuwertende Zelle wird der erste und letzte Stapel, auf dem sie vorhanden ist, bestimmt. Die Bildsequenz zwischen erstem und letztem Bild wird anschließend sequenziell abgearbeitet. Nachdem ein Stapel eingelesen worden ist, wird er als MIP angezeigt. Nach einem Klick auf den auszuwertenden Nukleus wird das Bild auf ein Fenster der Größe 70×70 Pixel um den Nukleus verkleinert. In diesem wird um den Nukleus eine Ellipse mittels der Matlab-Funktion *imellipse* gelegt (siehe Abb. 2.5b, blaue Kreise). Danach wird der nächste Stapel eingelesen.

Als Ergebnis dient die von der Ellipse eingeschlossene Fläche in Pixelanzahlen. Ausgehend von dort, kann wie oben beschrieben weiterverfahren werden.

Ergebnisse & Diskussion

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse vorgestellt. Für jedes Unterkapitel wird in einer Einleitung der Stand der Forschung sowie offene Fragen aufgezeigt. Nachdem die jeweiligen Resultate präsentiert und interpretiert wurden, werden sie schließlich zusammengefasst, diskutiert und kontextualisiert.

Auf das übergeordnete Thema der Arbeit wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit (Kap. 1) eingegangen. Es werden Gründe für die erstaunlich robuste und wiederholgenaue Embryogenese des *C. elegans* gesucht. Die Suche danach erfolgt in dieser Arbeit aus einer explizit physikalischen Perspektive. Die Abhängigkeit für die Entwicklung wichtiger Prozesse (Zellanordnung, Asymmetrie der Zellteilungen, Festlegung der Zellteilungszeiten etc.) von Umgebungs- und Randbedingungen (Temperatur, Eihülle, Zellgröße usw.) wird untersucht. Aus den Ergebnissen werden sodann biologisch vereinfachte Modelle konstruiert, die die Beobachtungen rationalisieren sollen. Der Anspruch dieser Modelle ist dabei explizit nicht, die zugrunde liegende Biologie vollständig abzubilden. So spielt die spezifische Funktion bestimmter Gene bzw. Proteine sicher eine wichtige Rolle für eine wiederholgenaue Entwicklung, kann diese allerdings alleine nicht befriedigend erklären. Vielmehr sollen hier die in der Biologie kodierten Wirkmechanismen, die den gewonnenen Beobachtungen zugrunde liegen, verständlich werden.

Die untersuchten Phänomene gruppieren sich dabei (mit Ausnahme der Untersuchung der Zellkerngrößen) um das Modell, welches in der Diplomarbeit des Autors entwickelt wurde (vgl. Kap. 1.1.4). Dort musste eine Reihe von Größen als gegeben angesehen werden. Dazu zählen die interzellulären Kräfte F_C und Kräfte zwischen Zellen und der Eihülle, F_W . Außerdem mussten alle Eigenschaften von Zellteilungen (Zeitpunkt, Achse und Asymmetrie) extern vorgegeben werden, ohne dass deren Zustandekommen bekannt ist.

In Kap. 3.1 werden zuerst die auf Zellen wirkenden Kräfte (im Modell sind dies F_C und F_W) bezüglich ihrer Ursache und ihres Einflusses auf die Robustheit der Embryogenese untersucht. Aufgrund der Bedeutung für alle späteren Kapitel ist im Anschluss daran der Bestimmung der Zellvolumina ein eigenes Kapitel gewidmet (Kap. 3.2). Danach werden die geometrischen Asymmetrien aller frühen Zellteilungen untersucht (Kap. 3.3). Das zeitabhängige Wachstum der Zellkerne während der Interphase wird in Kap. 3.4 behandelt. Kap. 3.5 thematisiert hingegen die Dauer der frühen Zellzyklen.

Mittels der so gewonnenen Ergebnisse kann schließlich ein großer Teil der experimentellen Eingabeparameter des Modells zur Zellanordnung durch Vorhersagen ersetzt werden, wodurch das Modell insgesamt deutlich eigenständiger wird (Kap. 3.6). Zudem kann nun mit dem Modell der Einfluss bestimmter Vorgänge/Skalierungen auf die Robustheit der Embryogenese getestet werden.

Insgesamt wurden während der Erstellung dieser Arbeit Langzeitaufnahmen von 107 Embryonen der Linien OD58, OD95 und XA3501 erstellt (siehe Kap. 2.1). Dabei wurden alle Aufnahmen der Linie OD95 und etwa die Hälfte der Aufnahmen der Linie XA3501 vom Autor dieser Arbeit durchgeführt (dies entspricht 70 % aller Aufnahmen). Die restlichen Embryonen (alle 10 der Linie OD58 und etwa 50 % der Linie XA3501) wurden von Philipp Struntz aufgenommen. Die Auswertung aller hier präsentierten Daten wurde vom Autor durchgeführt. Die Interpretation der Daten sowie die Modellbildung fand in Absprache mit Matthias Weiss statt.

Die Gründe für die Verwendung unterschiedlicher Wurmlinien sind wie folgt. In dieser Arbeit werden prinzipiell die Positionen und Größen der Zellkerne (Tracking und Nukleus-Segmentierung) sowie die Gestalt der Zellen (Membransegmentierung) aus den Aufnahmen ausgelesen, vergleiche Kap. 2.2. Alle genannten Größen sind prinzipiell in Aufnahmen der doppelmarkierten Linie OD95 zugänglich. Jedoch wurde der zweite Kanal (561 nm) erst im Dezember 2015 im SPIM implementiert. Zuvor mussten somit zwangsläufig rein GFP-markierte Embryonen verwendet werden, d.h. Embryonen der Linien XA3501 und OD58. Während manche Messungen mit der doppelmarkierten Linie OD95 wiederholt wurden, wurde z.B. bei der Messreihe zum Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung darauf verzichtet. Daher werden in den folgenden Kapiteln Daten aller drei Linien verwendet, wobei der Ursprung der jeweils verwendeten Daten immer genannt wird.

3.1. Einfluss der Rand- und Umgebungsbedingungen

In dem Modell zur Erklärung der Zellanordnung und -bewegung während der frühen Embryogenese (siehe Kap. 1.1.4) wurden zwei Kräfte postuliert. Diese sind die Zell-Zell-Wechselwirkung F_C sowie eine Kraft zwischen Zellen und der starren Eihülle, F_W . Mittels dieser Kräfte lassen sich die experimentell erhaltenen Zellkerntrajektorien ungestörter Embryonen in einer Simulation reproduzieren. Allerdings kann anhand des Modells bzw. der Simulation nichts über den Ursprung dieser Kräfte ausgesagt werden.

Ebenso wurde die Eihülle in dem Modell als starr angenommen. Dies ist durch die Chitinhülle in guter Näherung erfüllt. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, wie wichtig diese Starrheit für die Robustheit der Embryogenese ist (“weiche” Randbedingungen können in der aktuellen Simulation nicht physikalisch sinnvoll implementiert werden).

Beide Fragestellungen sollen an dieser Stelle behandelt werden. Hierfür wird zuerst die Embryogenese bei verschiedenen Umgebungstemperaturen verfolgt und in einem zweiten Schritt die starre Chitinhülle entfernt, wobei die etwas weichere EEM/Vitellinschicht erhalten bleibt.

Dieses Vorgehen gibt somit nicht nur Aufschluss über den Ursprung der wirkenden Kräfte, sondern testet auch die Robustheit der Embryogenese bezüglich der Rand- und Umgebungsbedingungen (Eihülle & Umgebungstemperatur).

3.1.1. Temperaturabhängigkeit der Zellbewegung

Einleitung

Wie bereits erwähnt wurde, ist der Ursprung der beiden repulsiven Kräfte F_C und F_W bisher nicht weiter spezifiziert und unbekannt. Es wurde angenommen, dass Zellen präferentiell eine sphärische Gestalt annehmen, so dass aus Deformationen die repulsiven Kräfte folgen. Als Ursache denkbar sind zum einen primär physikalische Eigenschaften der Zellen bzw. von Teilen davon. Dies kann z.B. eine Oberflächenspannung der Plasmamembran

[110] oder eine inhärente Elastizität (bzw. Viskoelastizität) der gesamten Zellen sein [111]. Eine Oberflächenspannung würde auch die Annahme sphärischer Zellen erklären. Die wirkenden Kräfte können aber auch die Folge ablaufender biochemischer Prozesse sein. So ist z.B. eine permanente Umordnung des Cytoskeletts, insbesondere des Aktomyosinkortex, eine ebenso denkbare Ursache der interzellulären Kräfte. Dies wird von der Tatsache untermauert, dass der Aktomyosinkortex die treibende Kraft hinter dem *mitotic cell rounding*, d.h. der Abrundung von Zellen während der Mitose in Tierzellen, ist [112, 113] (vgl. Kap. A.2). Zu dieser Phase versteift sich der Kortex lokal, was zu einer Minimierung der Krümmung und somit zu einer Kugelgestalt der Zellen führt. Dynamische Prozesse im Cytoskelett können folglich großen Einfluss auf die Zellform besitzen. Die Annahme, dass der Kortex in *C. elegans* zu allen Zeiten lokal einer minimalen Krümmung zustrebt, würde ebenso die bevorzugte sphärische Gestalt der Zellen erklären.

An dieser Stelle wird der Ursprung der Kräfte daher näher untersucht. Dies geschieht mittels der Beobachtung der Zell(kern)bewegung bei verschiedenen Umgebungstemperaturen. Da die Temperaturabhängigkeit der Zellzyklendauern bekannt ist (siehe unten), können durch einen Vergleich der Skalierungen Rückschlüsse auf die Art der wirkenden Kräfte gezogen werden.

Gleichzeitig wird dabei eine weitere interessante Fragestellung angegangen. Da *C. elegans* im Boden der gemäßigten Breiten lebt, ist er (auch während seiner Embryogenese) laufend Temperaturschwankungen unterworfen. Für eine erfolgreiche Entwicklung muss er auf diese Schwankungen der Umgebungsbedingungen auch bezüglich der Zellanordnungen robust reagieren. Wie dies geschieht ist ebenfalls Gegenstand dieses Kapitels.

Ergebnisse

Um oben aufgezeigte Fragestellungen zu beantworten wurden Embryonen der Linie XA-3501 bei verschiedenen Umgebungstemperaturen aufgenommen und die Zellkernbewegung verfolgt. Der verwendete Temperaturbereich reicht dabei von 15 °C bis 25 °C. Die Entwicklungsgeschwindigkeit hängt exponentiell von der Temperatur ab [114]. Bei Temperaturen unterhalb von 15 °C wird sie so klein, dass die nötigen Aufnahmedauern extrem lang werden. Daher wurde auf noch kleinere Temperaturen verzichtet. Ebenso wurden keine größeren Temperaturen als 25 °C verwendet, da dies das obere Ende des fortpflanzungsfähigen Bereiches für *C. elegans* ist [54, 114]. Die verwendeten Temperaturen waren 15 °C ($n = 5$ Embryonen), 17,5 °C ($n = 6$), 20 °C ($n = 7$), 22,5 °C ($n = 7$) und 25 °C ($n = 9$).

Zur Auswertung der Daten wird ein möglichst genauer Trackingalgorithmus benötigt. Aus diesem Grund wurde der in der Diplomarbeit des Autors [1] entwickelte Algorithmus optimiert, indem er um eine lokale Segmentierung der Zellkerne zur genaueren Bestimmung von deren Schwerpunkten erweitert wurde (siehe Kap. 2.2.1). Die Geschwindigkeit eines Zellkerns kann aus dem Tracking gemäß $v(t) = |\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t)|/\Delta t$ bestimmt werden. Hier ist $\mathbf{r}(t)$ die Position des Zellkerns zur Zeit t und Δt der zeitliche Abstand zweier Bildstapel. Dem Zellkerntracking sind jedoch selbst mit einem optimalen Algorithmus fundamentale Grenzen gesetzt. Dies liegt an der relativ großen Ausdehnung der Zellkerne, die viel größer sind als die Auflösungsgrenze des verwendeten Mikroskops und eine *a priori* nicht bekannte Form aufweisen. Daher führen Schwankungen der Nukleusform oder der im SPIM aufgenommenen Intensitätsverteilung in den Zellkernen unweigerlich zu Positionsungenauigkeiten (anders als z.B. beim Tracking von Teilchen unterhalb der Auflösungsgrenze, die immer als fitbare Punktspreizfunktion abgebildet werden und somit mit Subpixelpräzision getrackt werden können). Diese Positionsungenauigkeiten sind von der selben Größenordnung wie die Bewegung eines Zellkerns zwischen zwei Bildstapeln,

d.h. während $\Delta t = 30$ s. Eine präzise Analyse der Zellkerngeschwindigkeiten ist daher nicht möglich und wird nicht durchgeführt.

Stattdessen wird ein deutlich robusteres Maß verwendet, bei welchem die gemessenen Abstände die Positionsfehler signifikant übersteigen. Dies ist der zeitabhängige End-zu-End-Abstand $d(t)$ der Zellkerntrajektorien. Sei t_0 die Zeit, bei der die Anaphase der Mutterzelle beginnt (zu dieser Zeit beginnt die Trajektorie der jeweils betrachteten Zelle). Dann ist

$$d(t) = |\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t_0)| \quad \text{für } t \geq t_0. \quad (3.1)$$

Die Berechnung von $d(t)$ endet, wenn die Zelle erneut in die Anaphase eintritt und wird für alle Zellen des vier- und achtzelligen Zustandes in allen untersuchten Embryonen durchgeführt. Diese hier eingeführte Größe ist geeignet, den Verlauf einer Trajektorie durch ein skalares Maß zu charakterisieren. So bedeutet z.B. ein steiler Anstieg, dass sich die Zelle schnell von ihrem "Geburtsort" entfernt. Analog bedeutet ein Maximum mit anschließendem Absinken von $d(t)$, dass die Zelle ihre Bewegung umgekehrt hat und wieder näher an ihren Geburtsort migriert. Die Auswertung wird sich im Folgenden größtenteils auf die Temperaturabhängigkeit der Lage solcher Extrempunkte konzentrieren. Die Absolutwerte von $d(t)$ werden von mehreren Faktoren gestört, z.B. der Größe des Embryos und der Positionierung der Zellkerne innerhalb der Zellen. Beides zeigt (geringe) Schwankungen, so dass auch für die Absolutwerte von $d(t)$ geringe Schwankungen (einige μm) erwartbar sind.

Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Embryogenese (vgl. [1, 2] und Kap. 3.1.2) ist der Verlauf von $d(t)$ einer jeden Zelle stereotyp, d.h. für alle untersuchten Embryonen bei einer festen Temperatur ähnlich. Jedoch ist $d(t)$ durch geringe Positionsschwankungen der Zellen, Schwankungen der Positionierung der Zellkerne innerhalb der Zellen und vor allem Trackingfehler verrauscht (Abweichungen von wenigen μm). Aus diesem Grund wird hier $d(t)$ pro Zelle über alle Embryonen einer festen Temperatur zu $\langle d \rangle(t)$ gemittelt.

Die Ergebnisse für vier repräsentativ ausgewählte Zellen ($ABpr$, MS , E und P_3) sind in Abb. 3.1a für alle fünf untersuchten Temperaturen dargestellt (die im Folgenden diskutierten Ergebnisse gelten analog auch für alle anderen Zellen der frühen Embryogenese). Man erkennt, dass der Verlauf der Kurven $\langle d \rangle(t)$ bei allen Temperaturen qualitativ ähnlich ist, aber bei tieferen Temperaturen gestreckt ist. Maxima und Minima der Kurven sind folglich zu höheren Zeiten hin verschoben. Gleichzeitig werden die Lebensdauern der Zellen, d.h. die Zeit von Anaphase bis Anaphase, bei tieferen Temperaturen länger. Die Abweichungen der Absolutwerte betragen einige μm , was der oben vorhergesagten Größenordnung entspricht.

Es ist bekannt, dass die Dauern aller Teilphasen der ersten Zellteilung in *C. elegans* gemäß einem inversen Arrhenius-Gesetz exponentiell mit der Temperatur skalieren [114] (in Kap. 3.5 wird dies allgemein für alle Zellen und Phasen des Zellzyklus gezeigt, siehe insb. Abb. 3.27). Eine exponentielle Arrhenius-Skalierung [115] deutet darauf hin, dass die Geschwindigkeit des beobachteten Prozesses hauptsächlich durch eine biochemische Reaktionsrate bestimmt wird. Im konkreten Falle der Zellzyklendauer beziehen sich diese Reaktionsraten oftmals auf eine komplexe, rückkoppelnde Signalkaskade, den sog. Zellzyklen-Oszillator (siehe [116] und Kap. 3.5.1). Bei den meisten gemäß Arrhenius skalierenden biologischen/biochemischen Prozessen liegt der Q_{10} -Koeffizient bei etwa (2-3) [117]. Dieser Wert gibt an, um welchen Faktor die Reaktionsrate zunimmt, wenn die Temperatur um 10°C erhöht wird. Für die Dauer der Mitose von P_0 gilt ungefähr $Q_{10} \approx 2$ [114].

Die Skalierung der Zellzyklendauern kann an dieser Stelle folglich als bekannt vorausgesetzt werden. Um zu testen, ob die Zellmigration auf dieselbe Weise mit der Temperatur skaliert, werden die Kurven $\langle d \rangle(t)$ reskaliert: Es wird $\langle d \rangle$ gegen die normierte Größe

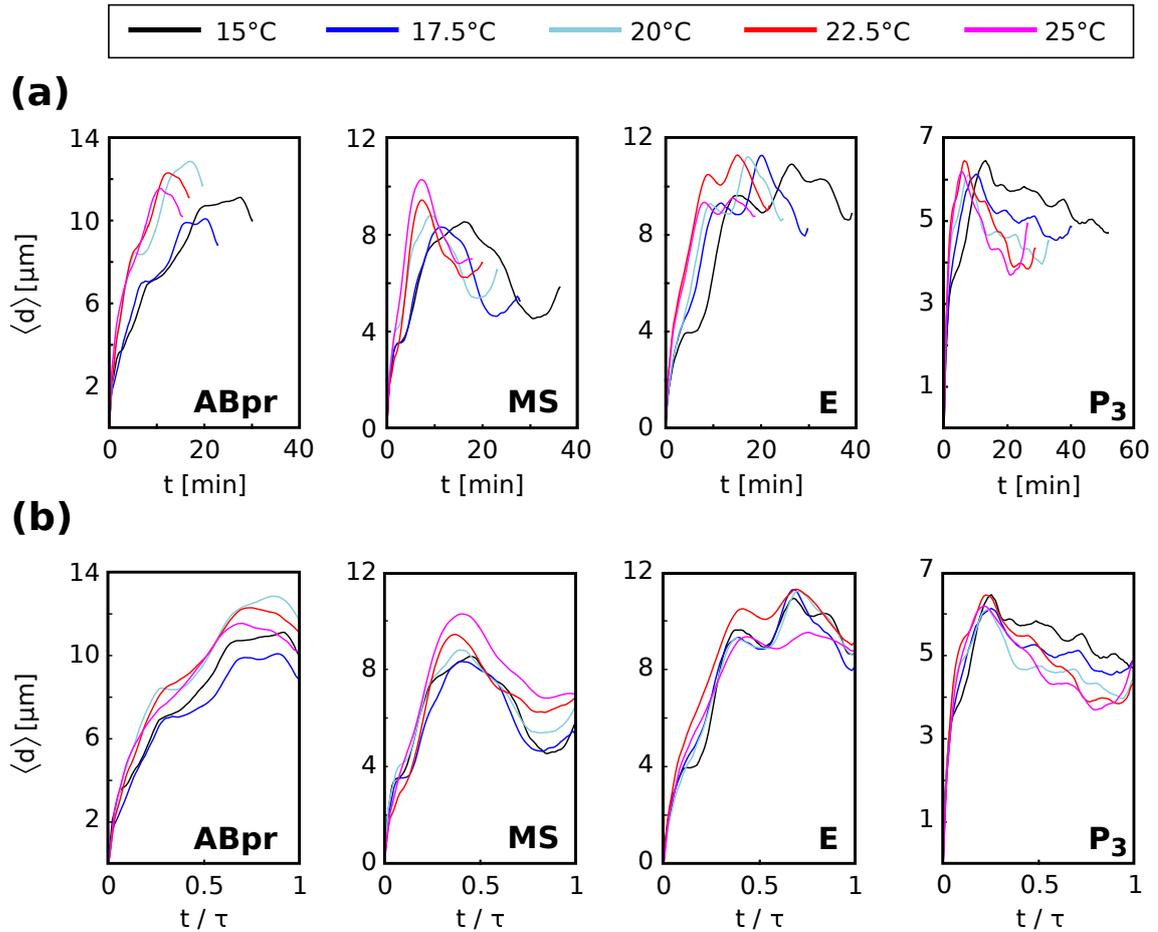


Abbildung 3.1.: Zeitabhängige End-zu-End-Abstände der Zellkerntrajektorien. (a) Aufgetragen sind die über alle Embryonen gemittelten zeitabhängigen End-zu-End-Abstände $\langle d \rangle(t)$ der Trajektorien gemäß Gl. 3.1 für vier repräsentativ ausgewählte Zellen (*ABpr* 1.v.l., *MS* 2.v.l., *E* 3.v.l., *P₃* 4.v.l.) und fünf Umgebungstemperaturen (schwarz: 15 °C, blau: 17,5 °C, cyan: 20 °C, rot: 22,5 °C, magenta: 25 °C). $\langle d \rangle$ wird für den gesamten Zellzyklus der jeweiligen Zellen berechnet (Anaphase bis Anaphase). Mit sinkender Temperatur verlängern sich die Zellzyklendauern exponentiell gemäß einer Arrhenius-Skalierung (siehe Text). Gleichzeitig verschieben sich Extrema der Kurven zu späteren Zeiten. (b) Werden die Kurven $\langle d \rangle$ gegen eine reskalierte Zeit $t/\tau(T)$ ($\tau(T)$ ist die temperaturabhängige Zellzyklendauer) aufgetragen, wird deutlich, dass alle Extrema zusammenfallen. Umkehrpunkte der Zellen finden folglich im gleichen (relativen) Stadium des Zellzyklus statt. Die Temperaturskalierung der Zellbewegung ist somit dieselbe wie die der Zellzyklendauern (Einzelheiten & Interpretation siehe Text). Schwankungen der Absolutwerte von $\langle d \rangle$ liegen im erwarteten Bereich einiger μm . Eine systematische und konsistente Temperaturabhängigkeit der $\langle d \rangle$ ist nicht erkennbar.

$t/\tau(T)$ aufgetragen. Hierbei ist $\tau(T)$ die temperaturabhängige Zellzyklendauer (Anaphase bis Anaphase). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1b für die Zellen *ABpr*, *MS*, *E* und *P₃* abgebildet. Es zeigt sich, dass in dieser Auftragung alle Extrempunkte (Maxima/Minima) der temperaturabhängigen Kurven $\langle d \rangle(t/\tau(T))$ zusammenfallen und daher im selben Abschnitt des Zellzyklus stattfinden. Diese Beobachtung gilt während des gesamten Zellzyklus. Folglich muss dies so interpretiert werden, dass die Temperaturskalierung der Zellbewegung mit der Temperaturskalierung der Zellzyklendauern übereinstimmt.

Diskussion

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass die Temperaturskalierung der Zellbewegung und der Zellzyklendauern dieselben sind. Es ist bekannt, dass Zellzyklendauern durch Signalkaskaden festgelegt werden und somit biochemischen Reaktionskinematiken unterworfen sind. Diese skalieren generell exponentiell gemäß Arrhenius mit der Temperatur. Da die Zellmigration dieselbe Skalierung zeigt, ist dies ein starker Hinweis darauf, dass auch die zugrunde liegenden Kräfte letztendlich durch biochemische, energieverbrauchende Reaktionen (z.B. der Bewegung von Motorproteinen) hervorgerufen werden. Andere denkbare Prozesse, wie z.B. die oben angesprochenen Oberflächenspannungen oder Elastizitäten der Zellen, würden eine andere, deutlich schwächere Skalierung der Zellmigration mit der Temperatur erwarten lassen [118].

Die beobachtete Skalierung gilt während des gesamten Zellzyklus, d.h., die Maxima/Minima von $\langle d \rangle(t/\tau)$ fallen für alle Zeiten t/τ zusammen. Für Zeiten kurz nach Eintritt in die Anaphase ($t/\tau \ll 1$) ist dies erwartbar, da die Bewegung der getrackten Chromatinanordnungen hier hauptsächlich durch aktive Zugkräfte der Spindel (durch Motorproteine) verursacht wird. Zu späteren Zeiten, bei denen eine Bewegung des Zellkerns einer Bewegung der gesamten Zellen entspricht, muss dies für die oben genannten alternativen Kraftursprünge jedoch nicht zwangsläufig der Fall sein. Die beobachtete Temperaturabhängigkeit zu späteren Zeiten zeigt jedoch, dass alle Phasen der Bewegung durch aktive Prozesse im Cytoskelett verursacht werden.

Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass in toten Embryonen (z.B. infolge zu großer Krafteinwirkung bei der Präparation oder letalen genetischen Modifikationen/RNAi) keine Zellmigration mehr festgestellt werden kann. Dies ist selbst dann der Fall, wenn die Zellen in einem gemäß dem Modell zur Zellanordnung instabilen Nichtgleichgewichtszustand angeordnet sind (eigene Beobachtung, Daten nicht gezeigt). Wäre tatsächlich eine Oberflächenspannung oder Elastizität für die Zellmigration verantwortlich, so sollten die Zellen auch in toten Embryonen in eine Gleichgewichts-anordnung relaxieren.

Schließlich können die hier erhaltenen Ergebnisse noch bezüglich der Robustheit der Embryogenese interpretiert werden. So konnte gezeigt werden, dass eine veränderliche Umgebungstemperatur innerhalb des fortpflanzungsfähigen Bereiches nur die Geschwindigkeit der ablaufenden Entwicklung beeinflusst (*“rescaling the clock”*). Bei höheren Temperaturen verkürzen sich die Zellzyklendauern und die Zellen treten bereits nach kürzerer Zeit in die nächste Mitose ein. Allerdings läuft die Zellmigration im gleichen Maße schneller ab, so dass sich die beobachteten Zellanordnungen für verschiedene Temperaturen nicht unterscheiden. Hierdurch wird die Embryogenese des *C. elegans* unempfindlich gegenüber Schwankungen der Umgebungstemperatur, die in der freien Natur immer auftreten.

3.1.2. Bedeutung der starren Eihülle

Einleitung

In diesem Kapitel soll die Bedeutung der Kraft F_W zwischen Zellen und der in dem Modell als vollkommen starr angenommenen Eihülle untersucht werden.

Wird die gesamte Eihülle, d.h. alle den Embryo umgebenden Schichten, entfernt, so hat die sich ergebende Zellanordnung keine Ähnlichkeit mehr mit jener in ungestörten Embryonen [58, 119]. Aufgrund der Orientierung der Zellteilungsachsen entsteht aus den Nachkommen von P_1 eine schlauchartige Anordnung, während die Nachkommenschaft von AB einem kugeligen Zellhaufen gleicht. Wegen fehlender Zellkontakte und somit fehlender Signaltransduktion sind solche Embryonen nicht überlebensfähig, sie stellen ihre Entwicklung im etwa 100-zelligen Zustand ein [119].

In Kap. 1.1.4 wurde eine aktuelle Studie von K. Yamamoto und A. Kimura vorgestellt [61]. Hierbei ergab sich, dass die Zellanordnung im vierzelligen Zustand bezüglich Änderungen der Eiform innerhalb gewisser Grenzen robust ist. Bei zu großen Abweichungen treten jedoch vermehrt (letale) Abweichungen auf.

Dies legt den Schluss nahe, dass eine Aufweichung (ohne komplette Entfernung) der Eihülle einen ähnlichen Einfluss auf die Robustheit der Entwicklung haben kann. An dieser Stelle wird daher die Zellanordnung in Embryonen untersucht, deren relativ starre Chitinhülle entfernt, die etwas elastischere Vitellinschicht allerdings belassen wurde.

Ergebnisse

Das experimentelle Protokoll zur Entfernung der Chitinhülle ist in Kap. 2.1 dargestellt. Insgesamt wurden $n = 11$ Embryonen der Linie OD95 ohne Chitinhülle bei $22,5^\circ\text{C}$ aufgenommen und ausgewertet. In Abb. 3.2a ist die zeitliche Entwicklung eines Embryos in Ausschnitten dargestellt (zwei-, vier-, acht- und zwölfzelliger Zustand).

Qualitative Evaluation. Die hier untersuchten Embryonen sind noch von der EEM/Vitellinschicht umgeben, die an dieser Stelle zwei Funktionen erfüllt. Erstens wirkt sie als nicht-permeable Membran und verhindert somit ein Anschwellen oder Schrumpfen des Embryos aufgrund einer abweichenden Osmolarität des umgebenden Mediums. Zweitens werden die Kräfte von der Eihülle auf die Zellen nun von der Vitellinschicht ausgeübt. Da sie etwas flexibler ist als die starre Chitinhülle, kann sie von den Zellen lokal deformiert werden. Dies ist in Abb. 3.2b für einen Embryo dargestellt, bei dem es aus unbekanntem Gründen zu einer Anreicherung von mCherry an der Vitellinschicht kam (in der Linie OD95 ist mCherry eigentlich an Histone gebunden). Der abgebildete Embryo wurde für die weitere Auswertung nicht verwendet, die Abbildung dient nur der Verdeutlichung der Flexibilität der Vitellinschicht.

Die lokale Deformierbarkeit der Vitellinschicht hat zur Folge, dass die Kräfte zwischen Eihülle und Zellen weniger wiederholgenau sind und zu einem gewissen Grad randomisieren. Dies hat bereits im vierzelligen Zustand weitreichende Folgen, wie Abb. 3.2c verdeutlicht. Während die Zellen in ungestörten Embryonen immer eine rautenförmige Anordnung einnehmen [2, 61], tritt in Embryonen ohne Chitinhülle ein Spektrum von Anordnungen auf. In etwa der Hälfte der Embryonen liegt immer noch eine rautenförmige Anordnung vor (z.B. in den beiden links abgebildeten in Abb. 3.2c). Daneben treten allerdings auch T-förmige Anordnungen und Mischformen auf (siehe die beiden rechts abgebildeten Embryonen in Abb. 3.2c). Diese Abweichungen setzen sich auch zu späteren Zeitpunkten fort, wie im Folgenden gezeigt wird.

Quantitative Evaluation. Um den Einfluss der starren Chitinhülle auf die Zellanordnung zu quantifizieren, werden die in Kap. 2.2.1 definierten Korrelationen verwendet.

Es wird ein Vergleichswert benötigt, um den Einfluss der fehlenden Chitinhülle auf die Bewegung der Zellen besser einschätzen zu können. Daher werden zuerst ungestörte Embryonen miteinander korreliert. In der vorangegangenen Diplomarbeit des Autors konnte gezeigt werden, dass die absoluten Positionsabweichungen der Zellkerne in verschiedenen Embryonen bis zum zwölfzelligen Zustand von der Größenordnung $3,5\ \mu\text{m}$ sind [1, 2]. Hier werden nun die Zellanordnungen in insgesamt $n = 8$ ungestörten Embryonen der Linie OD95 ($22,5^\circ\text{C}$) miteinander verglichen. Von den insgesamt zehn aufgenommenen ungestörten Embryonen der Linie OD95 zeigten zwei eine signifikante Rotation der gesamten Zellanordnung innerhalb der Eihülle, siehe Kap. A.1. Diese Rotation verändert zwar nicht

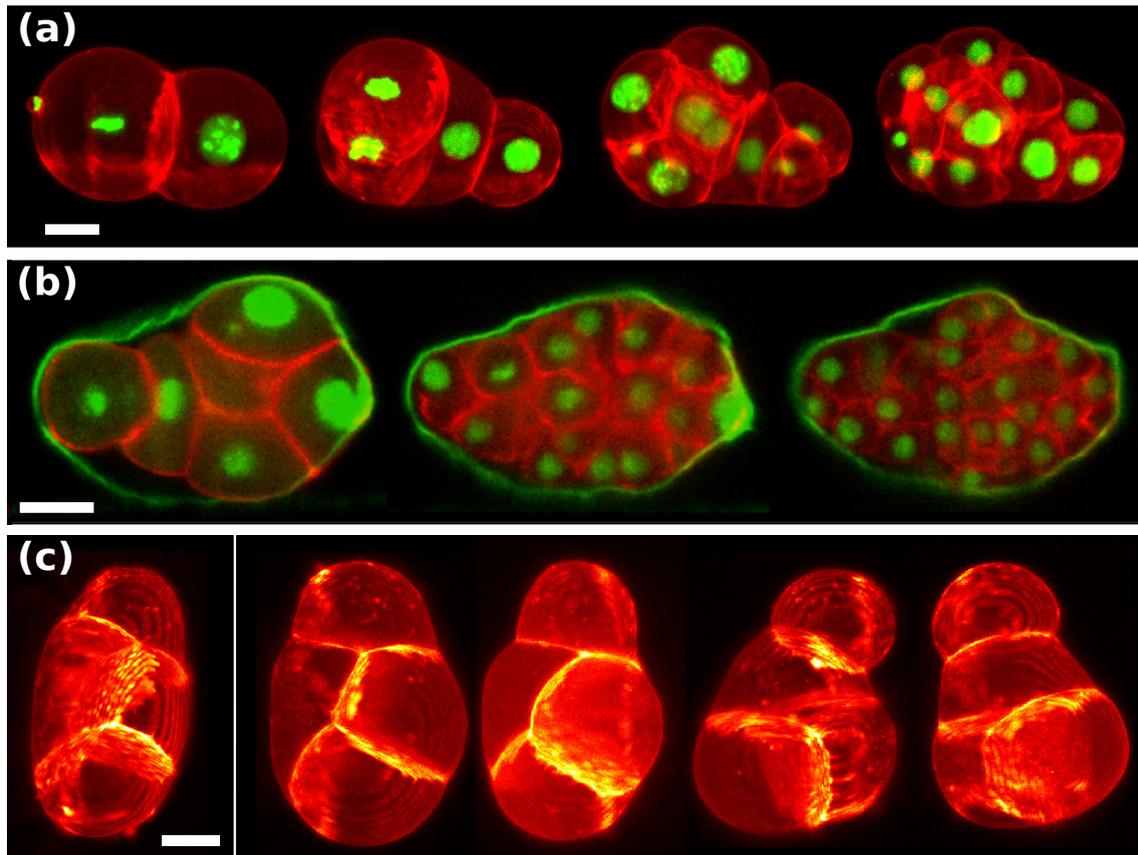


Abbildung 3.2.: Aufnahmen von Embryonen ohne starre Chitinhülle. Die Chitinhülle wurde enzymatisch entfernt (siehe Kap. 2.1), die EEM/Vitellinschicht blieb hingegen erhalten. **(a)** Entwicklung eines Embryos ohne Chitinhülle. Dargestellt sind Aufnahmen eines Embryos der Linie OD95 mit markiertem Chromatin (grün) und markierten Plasmamembranen (rot). Von links nach rechts: zwei-, vier-, acht- und zwölfzelliger Zustand. **(b)** *xy*-Ebenen von Aufnahmen eines Embryos ohne Chitinhülle der Linie OD95 (Farben wie (a)) bei drei unterschiedlichen, zufällig ausgewählten Entwicklungsstadien. Aus unbekanntem Grund fand hier eine Akkumulation von mCherry (grün) in der EEM/Vitellinschicht statt (grüne Einhüllende der Zellen). Man erkennt, dass die ellipsoidale Form des Embryos auch ohne starre Hülle im Wesentlichen erhalten bleibt, die Zellen die Vitellinschicht lokal jedoch durchaus deformieren können. **(c)** Links: Zellanordnung am Ende des vierzelligen Zustandes in einem ungestörten Embryo. Rechts: Zellanordnungen am Ende des vierzelligen Zustandes in vier Embryonen ohne Chitinhülle. Während manche Embryonen einen Phänotyp ähnlich dem ungestörter Embryonen zeigen, treten ebenso T-förmige Anordnungen auf (vgl. auch Kap. 1.1.4). Längenskala 10 μm .

die relative Lage der Zellen zueinander, aber die Lage der Körperachsen im Raum, was zu fehlerhaften Korrelationen führen würde. Die beiden Embryonen werden daher hier von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs dieser Aufnahmen sind in Abb. 3.3a dargestellt. Man erkennt, dass der Korrelationskoeffizient c während der gesamten ausgewerteten Entwicklungsdauer, d.h. vom Anfang des vier- bis zum Ende des 24-zelligen Zustandes, immer größer als 0,8 ist. Aufgrund geringer Fluktuationen in der Entwicklungsgeschwindigkeit weisen die Korrelationskurven eine unterschiedliche Länge auf (die Embryonen treten früher oder später aus dem 24-zelligen Zustand aus).

In Abb. 3.3b werden alle acht Trajektoriensätze mit einem darüber gemittelten korreliert. Da alle Trajektoriensätze bereits in einem gemeinsamen Koordinatensystem vorliegen und weiterhin sortiert sind (vgl. Kap. 2.2.1), ist eine solche Mittelung ohne Weiteres mög-

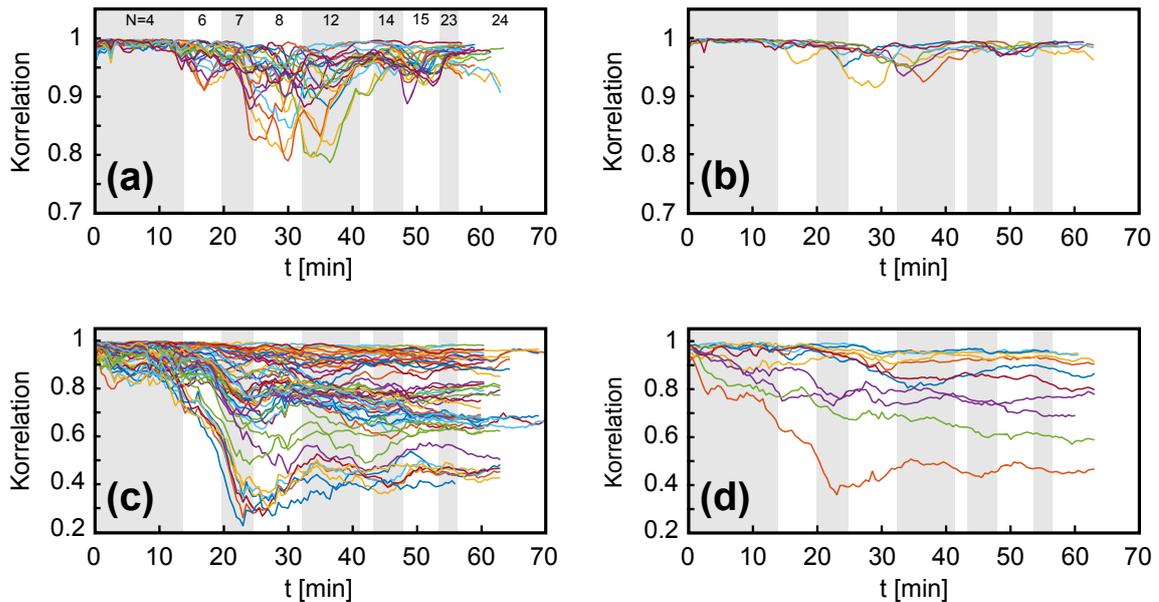


Abbildung 3.3.: Zeitabhängige Korrelationen der Zellkernanordnungen in verschiedenen Embryonen. (a) Paarweiser Vergleich der Nukleolanordnungen (Ergebnisse des Trackings) gemäß Gl. 2.1 in insgesamt 8 ungestörten Embryonen der Linie OD95 bei 22,5 °C. Verschiedene Kurven repräsentieren verschiedene Paarungen. Die Korrelationen wurden ab Beginn des vierzelligen Zustandes ($t = 0$ min) bis zum Ende des 24-zelligen Zustandes berechnet. Da sich der letzte Zeitpunkt leichten Fluktuationen unterworfen ist, ergeben sich unterschiedlich lange Kurven. Zudem ist die mittlere Zellanzahl als Funktion der Zeit mit eingetragen (graue und weiße Regionen, die Anzahl ist oben angegeben). (b) Vergleich aller 8 Embryonen mit einem darüber gemittelten Trajektoriensatz. Insgesamt ist die Korrelation bei ungestörten Embryonen groß ($c > 0,9$). (c) Wie (a), allerdings wurden hier $n = 11$ Embryonen ohne Chitinhülle verglichen (OD95, 22,5 °C). Die Korrelationen decken einen deutlich größeren Bereich ab als bei ungestörten Embryonen ($1 > c > 0,2$, zu Beachten ist die von (a,b) abweichende Skalierung der y -Achse!). (d) Hier wurden die Zellkernanordnungen von Embryonen ohne Eihülle mit dem gemittelten Trajektoriensatz ungestörter Embryonen aus (b) verglichen. Während ein Teil ebenso hohe Korrelationen wie in (b) aufweist, weicht etwa die Hälfte deutlich davon ab, d.h., die Zellanordnungen unterscheiden sich systematisch. Die mittlere Anzahl der Zellen ist in (b-d) wie in (a) kodiert dargestellt.

lich. In diesem mittleren Trajektoriensatz sind Fluktuationen, die in einzelnen Embryonen auftreten können, abgeschwächt. Somit entspricht er dem deterministischen Anteil der Zellbewegung, d.h. dem “Soll-Zustand” für eine erfolgreiche Entwicklung. Die Korrelationen liegen hier für alle untersuchten Embryonen bei allen Zeiten über 0,9. Wie in Kap. 2.2.1 gezeigt wurde, entspricht dies Absolutabweichungen von etwa 2 μm .

Dies zeigt die hohe Wiederholgenauigkeit der Zellanordnung, auf die schon mehrfach hingewiesen wurde. Zudem ist zu Beginn (bis etwa $t = 12$ min) eine Konvergenz der beobachteten Korrelationen aller Paarungen gegen $c = 1$ erkennbar. Zu dieser Zeit befinden sich die Embryonen im relativ lange andauernden vierzelligen Zustand. Die Konvergenz unterstreicht die Tatsache, dass die rautenförmige Zellanordnung bei ungestörten Embryonen äußerst stabil ist (vgl. [1, 2, 61]). Die Abnahme im acht- und zwölfzelligen Zustand der Korrelationen bei einzelnen Embryo-Paarungen ist eventuell ebenfalls Folge von den oben angesprochenen Zellrotationen, die bei einigen hier ausgewerteten Embryonen in abgeschwächtem Maß auftraten.

Wird die gleiche Analyse an Paarungen von Embryonen ohne Chitinhülle (insgesamt $n = 11$) vorgenommen, so ergeben sich Korrelationen wie in Abb. 3.3c gezeigt. Hier zeigen sich durch das teilweise Auftreten einer T-förmigen Anordnung bereits im vierzelligen Zustand stärkere Abweichungen. Diese werden in der Folge immer größer, so dass die

Zellanordnungen zu späteren Zeiten z.T. als nahezu unkorreliert angesehen werden können ($c < 0,5$, vgl. Abb. 2.2). Ein signifikanter Teil der Paarungen weist allerdings Werte von $c > 0,8$ auf. Die Zellanordnungen in vielen Embryopaarungen sind folglich trotz fehlender Chitinhülle vergleichbar.

Um zu testen, wie stark die Abweichungen vom Soll-Zustand ungestörter Embryonen sind, wurden alle elf Embryonen ohne Chitinhülle mit dem oben eingeführten gemittelten Trajektoriensatz ungestörter Embryonen verglichen (Abb. 3.3d). Etwa die Hälfte der elf untersuchten Embryonen weist durchgängig einen Wert $c > 0,8$ und damit eine dem ungestörten Fall ähnliche Zellanordnung auf. Diese Embryonen zeigten im vierzelligen Zustand eine rautenförmige Anordnung. Die anderen Embryonen zeigen hingegen zum Teil starke Abweichungen vom ungestörten Fall ($c < 0,8$). Dies trifft insbesondere auf solche zu, bei welchen im vierzelligen Zustand eine T-förmige Zellanordnung vorliegt.

Während Embryonen ohne Eihülle ihre Entwicklung unweigerlich einstellen (siehe oben), können solche ohne Chitinhülle ihre Embryogenese durchaus abschließen und sich zu adulten Würmern entwickeln. Eine notwendige Voraussetzung dafür ist allerdings eine rautenförmige Anordnung im vierzelligen Zustand [61], so dass ABp und P_2 in Kontakt sind [120]. Von den untersuchten Embryonen konnte bei insgesamt drei ein Schlüpfen festgestellt werden (alle mit rautenförmiger Anordnung). Da dies nicht für alle untersuchten Embryonen getestet wurde, besitzt diese Aussage jedoch keinen statistischen Wert, sondern verdeutlicht nur, dass eine erfolgreiche Entwicklung selbst ohne Chitinhülle prinzipiell möglich ist.

Diskussion

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die starre Chitinhülle neben dem Schutz vor mechanischen Umwelteinflüssen noch einen weiteren Zweck erfüllt: sie stellt wiederholgenaue Randbedingungen zur Verfügung, wodurch auch die wirkenden Kräfte (\mathbf{F}_W) einen deterministischen Charakter erhalten und zu hochgradig reproduzierbaren Zellanordnungen führen.

Dieses Ergebnis komplementiert die Studie von K. Yamamoto und A. Kimura bezüglich der Eiform [61]. Die Chitinhülle, insbesondere ihre Form und Starrheit, ist somit ein wichtiges Element, um die hohe Erfolgsrate der Embryogenese des *C. elegans* sicherzustellen.

Andererseits zeigt sich bei beiden Untersuchungen auch die große Robustheit der Embryogenese des *C. elegans*. Die Störungen, ob durch veränderte Eiform oder Entfernung der Chitinhülle, können sehr groß sein. Dennoch entwickelt sich ein nicht vernachlässigbarer Anteil der Embryonen bis zum adulten Wurm.

3.2. Zellvolumina während der frühen Embryogenese

Wie in Kap. 2 bereits angedeutet wurde, nimmt die Bestimmung der Zellvolumina während der frühen Embryogenese im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Schlüsselrolle ein. Daher werden die Ergebnisse an dieser Stelle in einem eigenen Kapitel behandelt. Auf Ansätze anderer Arbeitsgruppen wurde in Kap. 2.2.2 bereits eingegangen. Zuerst wird die Bestimmung der Zellvolumina in ungestörten Embryonen der Linien OD58 und OD95 behandelt. Danach wird auf in dieser Arbeit verwendete Möglichkeiten der Störung der embryonalen Entwicklung und deren Auswirkungen auf das embryonale Gesamtvolumen eingegangen.

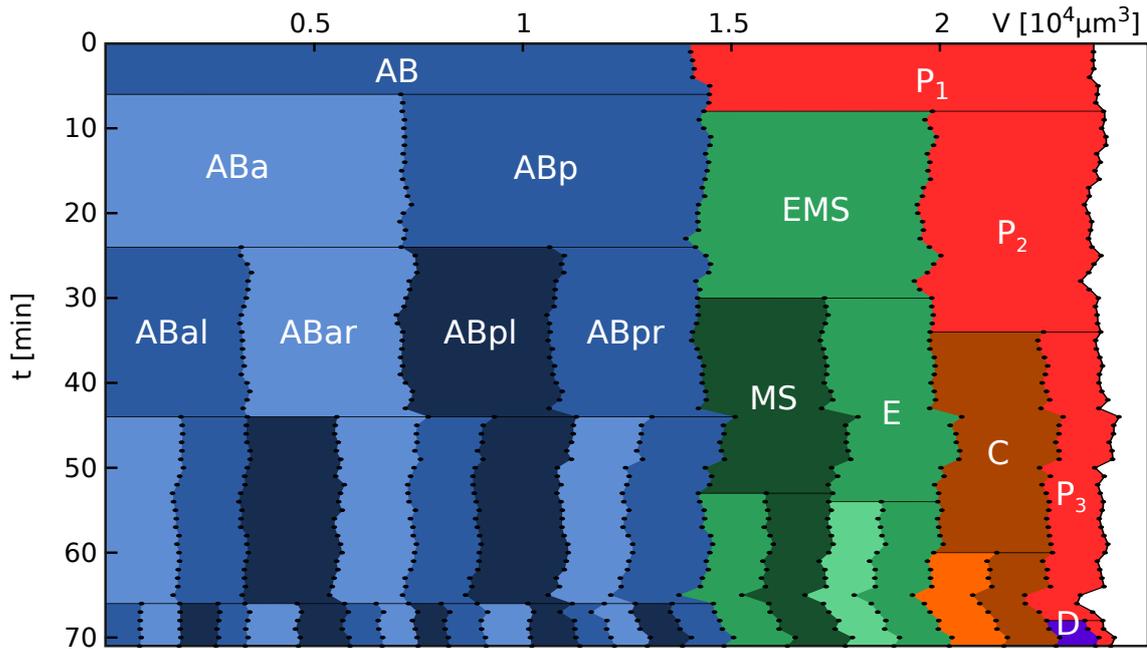


Abbildung 3.4.: Zeitaufgelöste Bestimmung der Zellvolumina. Die Zellvolumina wurden mittels Segmentierung der Aufnahmen eines Embryos der Linie OD58 erhalten. Gezeigt ist das Zellgesamtvolumen (Summe über alle Einzelvolumina, rechte Punktreihe) sowie die Aufteilung auf einzelne Zellen (Farbcodierung & Benennung) als Funktion der Zeit. Dabei repräsentiert jeder schwarze Punkt eine einzelne Messung. Zellteilungen (d.h. das Ende der Cytokinese) sind als schwarze horizontale Linien eingezeichnet. Die Zellvolumina zeigen keine signifikante Zeitabhängigkeit. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei Zellen späterer Generationen auf eine Benennung verzichtet.

3.2.1. Zellvolumina in ungestörten Embryonen

Der zur Segmentierung von Aufnahmen membranmarkierter Embryonen benutzte Algorithmus wurde in Kap. 2.2.2 vorgestellt und diskutiert. Als Ergebnis der Segmentierung liegen Bilder vor, in welchen die Zugehörigkeit jedes Voxels zu einer bestimmten Zelle eindeutig markiert ist. Daher ist für einen dreidimensionalen Bildstapel für alle n in ihm enthaltenen Zellen i ($i = 1, \dots, n$) bekannt, durch wieviele Voxel N_i die Zelle i repräsentiert wird. Die Abmessung $l_x/l_y/l_z$ eines Voxels im Objektraum, d.h. das von einem Voxel repräsentierte Volumen V_{vox} in der Probe, ist ebenso bekannt (siehe Kap. 1.2.2). Somit kann auf das Volumen V_i der Zelle i in dem Bildstapel geschlossen werden. Es ist $V_i = V_{vox} \cdot N_i = l_x l_y l_z \cdot N_i$.

In Kap. 2.2.2 wurde auf die verschiedenen Methoden des *seedings*, d.h. der Platzierung der Expansionskeime, bei den Linien OD58 und OD95 eingegangen. Hierbei ergeben sich weitreichende Unterschiede. Jede Zelle wird während ihrer Zyklendauer mehrfach aufgenommen und segmentiert, so dass mehrere unabhängige Messungen ihres Volumens vorliegen. In Aufnahmen der Linie OD58 erfolgt das *seeding* jedes Stapels manuell und das Ergebnis wird nach Beendigung der Segmentierung kontrolliert. Bei groben Fehlern wird der Stapel erneut behandelt, wobei entweder die Positionen der *seeds* oder die Parameter angepasst werden. Zellen werden so lange mit einem *seed* initialisiert, bis die Cytokinese vollständig abgeschlossen ist.

Die mit diesem Verfahren gewonnenen zeitabhängigen Volumina sind in Abb. 3.4 für einen repräsentativen Embryo dargestellt. Hier ist zu beachten, dass jeder Punkt in dem Graphen prinzipiell eine eigene Messung darstellt. Man erkennt, dass die einzelnen Mess-

werte der Zellvolumina nur wenig fluktuieren. Auch eine zeitabhängige systematische Änderung des Zellvolumens ist nicht erkennbar. Dies wäre möglich, da die Zellen das Volumen innerhalb der Eihülle nicht komplett ausfüllen und so ein osmotisch getriebenes Anschwellen z.B. für das *mitotic cell rounding* ausnutzen könnten [121]. Da die Fluktuationen der gemessenen Zellvolumina gegenüber den absoluten Volumina klein sind, wird bei Aufnahmen der Linie OD58 der arithmetische Mittelwert aller Einzelmessungen während des Zellzyklus als finales Zellvolumen verwendet.

Bei Aufnahmen der Linie OD95 ist dies nicht angemessen. Hier wird aufgrund der Verwendung der Trackingergebnisse eine Zelle bereits ab der Anaphase mit zwei *seeds* initialisiert. Die Segmentierungsergebnisse am Anfang des Zellzyklus (vor Beendigung der Cytokinese) liefern daher keine verlässlichen Werte für die Zellvolumen. Des Weiteren können bei einzelnen Zellen in einzelnen Bildstapeln grobe Fehler in der Segmentierung auftreten, ohne dass diese korrigiert werden können. So kann es etwa zu Untersegmentierungen kommen, da die expandierende Region ein Schattenartefakt nicht überwinden kann. Andererseits können Übersegmentierungen auftreten, wenn eine Region in eine benachbarte Zelle “überläuft” (diese Nachbarzelle wird folglich untersegmentiert).

Solche Fehler sind in Linie OD58 durch die Platzierung der *seeds* behebbar. Gerade bei späteren Entwicklungsstufen mit vielen Zellen ist eine manuelle Initialisierung allerdings nicht mehr möglich, so dass sich hier auf die Trackingergebnisse verlassen werden muss. Aus den genannten Gründen treten bei der Volumenbestimmung in Aufnahmen der Linie OD95 in einzelnen Bildstapeln oft signifikante Abweichungen vom “wahren” Volumen auf, so dass die Verwendung des arithmetischen Mittelwerts wie bei Linie OD58 nicht angebracht ist. Es hat sich gezeigt, dass hier die Verwendung des Median-Wertes gute Ergebnisse liefert.

Aufgrund der oben geschilderten Unterschiede kann die Volumenbestimmung anhand der Linie OD58 als prinzipiell genauer angesehen werden. Zur Einordnung der Genauigkeit der gemessenen Volumen in Linie OD95 bietet sich daher ein Vergleich der beiden Ergebnisse an. Die Volumen aller Zellen bis zum 24-zelligen Zustand wurden in $n = 10$ Embryonen der Linie OD58 sowie in $n = 10$ Embryonen der Linie OD95 gemessen. Die mittleren, nach oben dargelegten Schemata bestimmten Zellvolumen werden in Abb. 3.5a gezeigt. Wie man erkennt, stimmen die Daten gut überein. Die Werte der in Linie OD95 bestimmten Volumen sind meist leicht höher als die in Linie OD58 bestimmten, die Abweichung beträgt im Mittel $(4,7 \pm 8,0)\%$ (Mittelwert + Standardabweichung). Wegen dieser guten Übereinstimmung werden die Ergebnisse beider Linien im Rest dieser Arbeit als gleichwertig behandelt.

Der Volumenerhalt bei Zellteilungen kann als weiterer Test für die Güte der Volumenbestimmung herangezogen werden. Da es sich bei Zellteilungen während der frühen Embryogenese des *C. elegans* um reine Furchungsteilungen, also Teilungen ohne darauf folgenden Volumenzuwachs, handelt, muss die Summe der Tochterzellvolumina dem Volumen der Mutterzelle entsprechen. Für alle Zellen, die vor dem Erreichen des 24-zelligen Zustandes existieren, wurde die Größe $\delta = (V_{T1} + V_{T2} - V)/V$ berechnet. Dabei ist V das über alle untersuchten Embryonen gemittelte Zellvolumen und $V_{T1/2}$ das der beiden Tochterzellen. Abb. 3.5b zeigt, dass die prozentuale Abweichung jeweils nur wenige Prozent beträgt, wobei kein systematischer Trend festgestellt werden kann. Für Linie OD58 ergibt sich eine mittlere Abweichung $\langle \delta \rangle$ von $(-1,1 \pm 3,3)\%$ (Mittelwert + Standardabweichung), bei Linie OD95 beträgt diese $(-0,7 \pm 2,8)\%$. Die mittleren Absolutabweichungen $\langle |\delta| \rangle$ betragen $(2,6 \pm 2,2)\%$ für OD58 sowie $(2,3 \pm 1,7)\%$ für OD95.

Diskussion. Insgesamt lässt sich damit feststellen, dass mit dem entwickelten Algorithmus die Zellvolumen erstmals präzise quantifiziert werden können. Im Gegensatz zu bis-

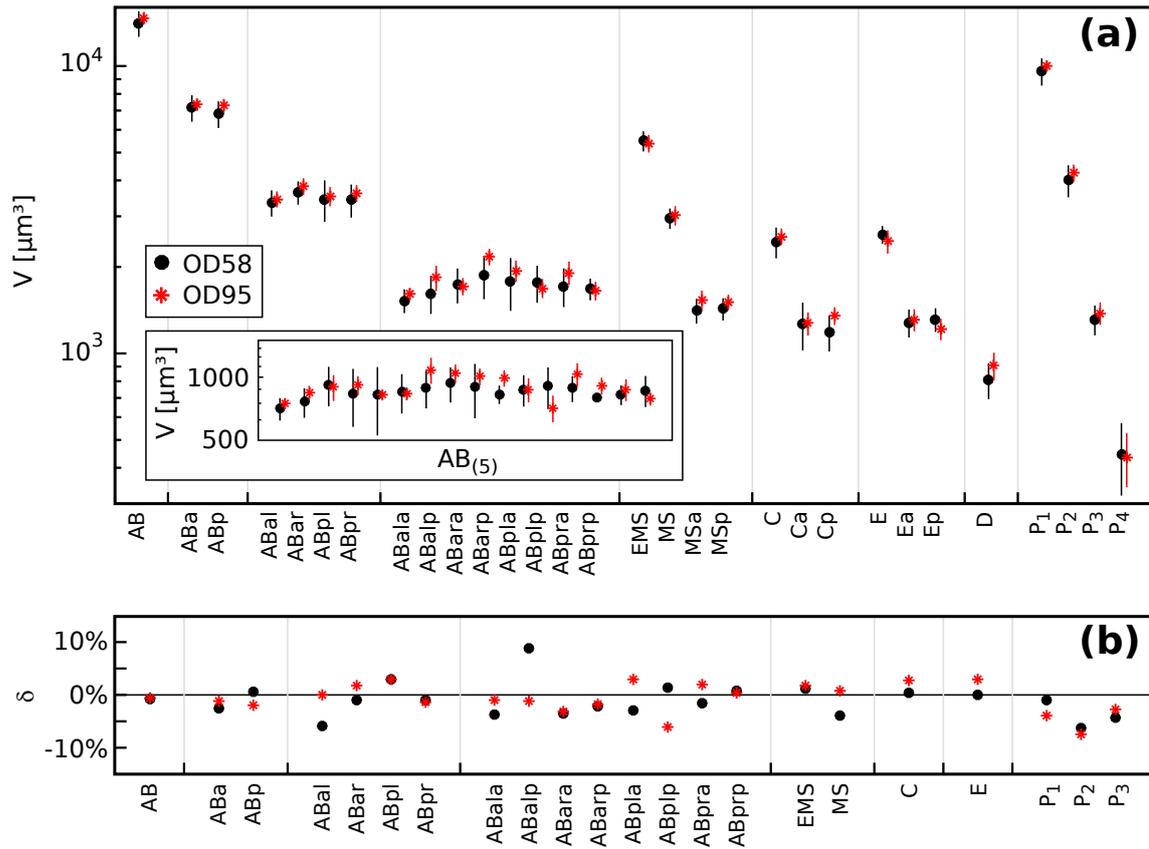


Abbildung 3.5.: Güte der Volumenbestimmung. (a) Mittlere Zellvolumina V aller bis zum 24-zelligen Zustand vorhandenen Zellen. Die Mittelwerte der Zellvolumen der Linie OD58 (schwarze Punkte) wurden über $n = 10$ Embryonen, die Medianwerte der Zellvolumen der Linie OD95 (rote Sterne) über $n = 10$ Embryonen gemittelt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. **Einfügung:** Volumen der fünften AB -Generation (Sortierung nach demselben Schema wie im Hauptgraph). (b) Abweichung δ der Summe der Tochterzellvolumina $V_{T1/2}$ von dem der Mutterzelle, V , $\delta = (V_{T1} + V_{T2} - V)/V$ (siehe Text). Die Abweichungen sind generell klein, was für eine fortlaufend hohe Qualität der Segmentierungsergebnisse spricht. Ein systematischer Trend ist nicht erkennbar.

herigen Ansätzen anderer Arbeitsgruppen sind im Rahmen der experimentell erreichten Auflösung der Bilder hierzu keine Näherungen nötig (siehe Kap. 2.2.2). Da das Volumen einer Zelle während ihres Zellzyklus zudem viele Male gemessen wird, werden vereinzelt auftretende große Messfehler unterdrückt.

Die Fluktuationen im Ensemble der untersuchten Embryonen sind relativ klein (siehe Fehlerbalken in Abb. 3.5a), d.h., die Volumenverhältnisse bei Zellteilungen sind bei *C. elegans* wiederholgenau. Dies ist Gegenstand von Kap. 3.3, das sich mit asymmetrischen Zellteilungen beschäftigt.

3.2.2. Embryonale Gesamtvolumina in gestörten Embryonen

Im Laufe dieser Arbeit wird der Einfluss diverser Störungen auf verschiedene Aspekte der Entwicklung untersucht. Die Störungen sind genetischer und mechanischer Natur.

Eine mechanische Störung ist die Entfernung der starren Chitinhülle (siehe Kap. 1.1.3 & Kap. 2.1), wobei die EEM/Vitellinschicht als Permeabilitätsbarriere erhalten bleibt. Hier sollte sich das embryonale Gesamtvolumen nicht ändern (die Änderung der Zellvolumen

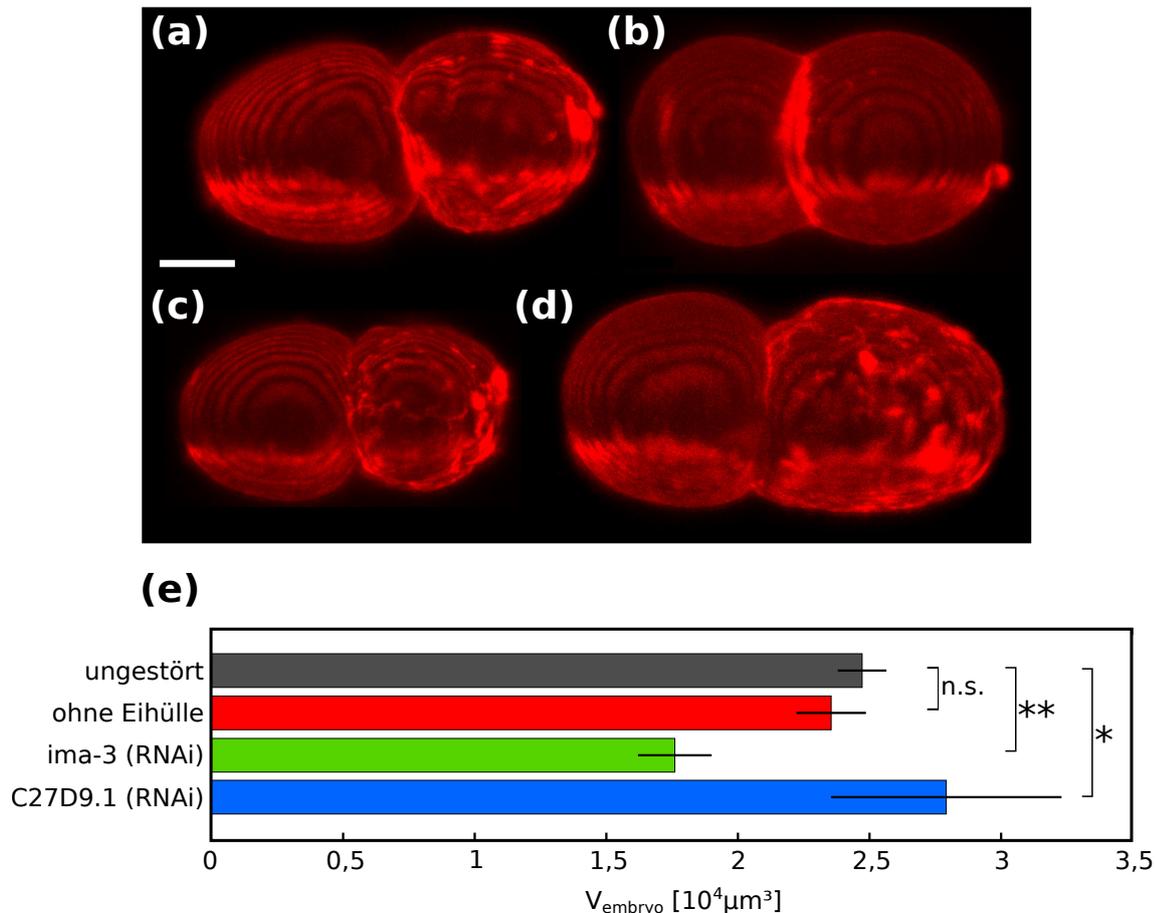


Abbildung 3.6.: Einfluss induzierter Störungen auf das embryonale Gesamtvolumen. Die Embryogenese wurde in dieser Arbeit auf genetischem und mechanischem Weg gestört, d.h. mittels RNAi und durch die Entfernung der starren Chitinhülle. (a) zeigt zum Vergleich einen ungestörten Embryo. In (b) ist ein Embryo ohne Eihülle abgebildet. (c) Ausschaltung des Gens *ima-3* mittels RNAi führt zu kleineren Embryonen, Ausschaltung des Gens C27D9.1 hingegen zu größeren (d). Alle 4 Abbildungen zeigen den Membrankanal von Embryonen der Linie OD95. Die Embryonen in (a) & (c-d) befinden sich im einzelligen Stadium (*Pseudocleavage*), der Embryo in (b) im zweizelligen Zustand (Aufnahmen dieser Kondition starten generell im zweizelligen Zustand). Längenskala 10 μm . (e) Embryonale Gesamtvolumen für alle vier Konditionen (Mittelwerte + Standardabweichungen, $n = (3 - 11)$, Details siehe Text). Der Unterschied zwischen ungestörten Embryonen und solchen ohne Chitinhülle ist nicht signifikant (n.s.), die zwischen ungestörten Embryonen und durch RNAi veränderten hingegen schon (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, jeweils Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test).

durch geänderte Teilungsverhältnisse ist Gegenstand des Kap. 3.3). In Abb. 3.6(a-b) ist ein ungestörter Embryo einem ohne Chitinhülle gegenübergestellt.

In dieser Arbeit verwendete genetische Manipulationen der Embryonen umfassen die gezielte Ausschaltung bestimmter Gene mittels RNAi (siehe Kap. 2.1). Hier wurden zwei Gene deaktiviert, die beide die embryonale Größe beeinflussen. Einerseits war dies das Gen *ima-3*. Würmer, die das korrespondierende Protein IMA-3 nicht exprimieren, produzieren kleinere Embryonen als ungestörte Würmer [102, 107, 122] (siehe Abb. 3.6c). Wird das Gen C27D9.1 ausgeschaltet, führt dies hingegen zu größeren Embryonen [102, 103, 122, 123] (siehe Abb. 3.6d).

An dieser Stelle wird der Einfluss der drei genannten Störungen auf das embryonale Gesamtvolumen untersucht. Hierzu wird von allen Messungen an der Linie OD95 das Gesamtvolumen als Summe der Zellvolumen von *AB* und *P₁* berechnet ($n = 10$ ungestörte

Embryonen, $n = 11$ ohne Eihülle, $n = 8$ C27D9.1 (RNAi) und $n = 3$ ima-3 (RNAi)). Die aus diesen Ensembles erhaltenen mittleren Gesamtvolumen und Standardabweichungen sind in Abb. 3.6e dargestellt. Man erkennt, dass das Gesamtvolumen von Embryonen ohne Eihülle dem ungestörten relativ ähnlich ist. Ein Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test ergibt, dass sich die beiden Ensembles bei einem 5%-Signifikanzniveau nicht signifikant unterscheiden. Die Ausschaltung von ima-3 führt hingegen zu Embryonen mit einem um etwa 30% reduzierten Volumen. Der Unterschied ist signifikant (Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test, $p = 0,006$). Wird hingegen C27D9.1 ausgeschaltet, so nimmt das embryonale Gesamtvolumen um durchschnittlich circa 15% zu. Auch hier ist der Unterschied signifikant ($p = 0,035$). Die Standardabweichung bei diesem Ensemble ist relativ groß, was auf schwankende Effizienz der RNAi hindeuten kann.

Diskussion. Abschließend kann festgehalten werden, dass die verwendeten genetischen Methoden ihren Zweck erfüllen und das embryonale Volumen signifikant verändern. Mechanische Störungen, d.h. die Entfernung der starren Chitinhülle, haben hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das Embryovolumen.

3.3. Geometrisch asymmetrische Zellteilungen

Dieses Kapitel behandelt geometrisch asymmetrische Zellteilungen während der frühen Embryogenese des *C. elegans*. Nach einer kurzen Einleitung werden der Stand der Forschung diskutiert und offene Fragen aufgezeigt. Anschließend werden die Ergebnisse für somatische und Keimbahnzellen präsentiert. Um die Asymmetrien der Keimbahnzellen zu erklären wird zudem ein mechanisches Modell entwickelt. Abschließend werden die Ergebnisse kontextualisiert und diskutiert.

Auszüge dieses Kapitels wurden 2017 in *Scientific Reports* veröffentlicht [124].

3.3.1. Einleitung

Asymmetrische Zellteilungen spielen in der Entwicklung (vielzelliger) Lebewesen eine tragende Rolle. Sie sind nötig, um aus einer befruchteten Eizelle eine Vielzahl an z.T. hochgradig spezialisierten Zellen entstehen zu lassen. Aus diesem Grund treten asymmetrische Zellteilungen in nahezu allen Organismen auf, von Bakterien bis hin zu Säugern [125]. Hierbei kann zwischen extrinsischer und intrinsischer Asymmetrie unterschieden werden [126, 127]. Extrinsisch asymmetrische Teilungen sind solche, bei welchen die Tochterzellen erst durch Signaltransduktion mit Nachbarzellen unterschiedliche Entwicklungspotentiale annehmen. Bei intrinsischen Zellteilungen hingegen werden die Zellen bereits während der Zellteilung mit unterschiedlichen biochemischen Zusammensetzungen ausgestattet, so dass sie auch ohne Wechselwirkung mit anderen Zellen unterscheidbar sind. Das folgende Kapitel beschränkt sich auf intrinsische Asymmetrien.

Eine biochemisch asymmetrische Zellteilung kann durch vier aufeinanderfolgende Schritte erreicht werden [128]: Zuerst findet ein Symmetriebruch in der Mutterzelle statt. Daraufhin polarisiert sich die Mutterzelle. Als drittes werden die ungleich zu verteilenden Bestandteile der Zelle entlang der Polarisationsachse aufgeteilt, so dass sich ein Gradienten aufbaut. Zuletzt wird die mitotische Spindel entlang des Gradienten ausgerichtet, so dass die Teilung der Zelle zu einer korrekten Partitionierung des Zellinhaltes auf die Tochterzellen führt. Der letzte Schritt ist essentiell für die Güte der asymmetrischen Aufteilung des Zellinhaltes und wird daher i.A. durch das komplexe Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener Proteine kontrolliert.

Solche biochemischen Asymmetrien werden häufig von geometrischen Asymmetrien begleitet. Es entstehen folglich zwei Tochterzellen mit unterschiedlichen Volumina. Da die Cytokinese in einer Ebene stattfindet, die durch die Lage der Metaphasen-Platte definiert wird [18], muss die Spindel hierfür notwendigerweise eine exzentrische Position einnehmen. Dies wird i.A. durch ein Ungleichgewicht der auf die Spindel wirkenden Kräfte entlang der Polarisationsachse erreicht. Die Kontrolle der Spindelposition spielt dabei eine ähnlich wichtige Rolle wie die oben angesprochene Kontrolle der Spindelorientierung.

Die molekularen Vorgänge bei jedweder Art asymmetrischer Zellteilung sind Gegenstand intensiver Forschung. Häufig verwendete Modellorganismen sind hierbei *Drosophila melanogaster* und vor allem *C. elegans*. Die gefundenen Mechanismen sind für verschiedene Spezies sehr ähnlich, d.h. evolutionär konserviert [129–131]. Ergebnisse besitzen somit allgemeine biologische bzw. biophysikalische Relevanz.

Geometrisch asymmetrische Zellteilungen in *C. elegans* - Stand des Wissens

In der Literatur werden während der frühen Embryogenese des *C. elegans* gemeinhin die Teilungen der Zygote P_0 sowie der Zellen P_1 , P_2 , P_3 und *EMS* als (biochemisch und geometrisch) asymmetrisch beschrieben [20, 31, 132]. Die Asymmetrie der Zellteilung von *EMS* wird durch den Kontakt mit P_2 induziert [95, 133]. Andere in diesen frühen Stadien auftretende (somatische) Zellen weisen zwar während ihrer Teilung z.T. Gradienten verschiedener Proteinverteilungen auf, allerdings sind diese orthogonal zur Teilungsachse und sorgen somit nicht für unterscheidbare Tochterzellen [134].

Die Erforschung molekularer Vorgänge bei geometrisch asymmetrischen Zellteilungen in *C. elegans* beschränkt sich bisher nahezu vollständig auf die Teilung der Zygote P_0 . Die biochemischen Prozesse zur Polarisierung sind genau untersucht. Dies gilt eingeschränkt auch für die Mechanismen der Kraftgeneration. Da über die Thematik bereits eine große Zahl an Review-Artikeln erschienen ist [20, 128–130, 135–141], sollen hier nur die für diese Arbeit grundlegenden Ergebnisse zusammengefasst werden.

Auf die initiale Polarisierung der Zygote wurde bereits in Kap. 1.1.3 eingegangen. Mittels eines Turing-ähnlichen Advektions-Reaktions-Diffusions-Systems erfolgt die Trennung verschiedener PAR-Proteine (*partitioning defective*) im Kortex in eine anteriore und eine posteriore Domäne [45] (auführliches Review in [20]; PAR-1 und PAR-2 posterior; PAR-3, PAR-6 und PKC-1 anterior). Entlang dieser Domänen werden weitere Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen lokalisiert, d.h. es bauen sich weitere Gradienten auf [20].

Die Polarisierung der Keimbahnzellen P_1 , P_2 und P_3 erfolgt auf ähnliche Weise, d.h., sie baut ebenfalls auf dem PAR-System auf [20, 46]. Die Polarisierung findet jedoch nicht zwingend entlang der AP-Achse wie in P_0 statt. Während dies in P_1 noch der Fall ist, weicht die Polarisationsachse in P_2 und P_3 davon ab. Die Richtung wird hier über Zell-Zell-Wechselwirkungen induziert [142].

Bei der Zellteilung von P_0 wird die aufgebaute Polarisierung der Zelle in eine geometrische Asymmetrie übersetzt, bei der die größere anteriore Tochterzelle *AB* und die kleinere posteriore Tochterzelle P_1 entstehen. Dies erfolgt durch eine Verschiebung der mitotischen Spindel während der Metaphase in posteriore Richtung [143], wodurch auch die Ebene der Cytokinese in diese Richtung verschoben ist [18]. Die hierfür nötigen Kräfte sind Zugkräfte, die im Kortex erzeugt werden [143, 144] und von astralen Mikrotubuli auf die Spindelpole übertragen werden [143, 145]. Hauptakteure sind hierbei die Proteine GPR-1/2, $G\alpha$ mit den beiden Untereinheiten GOA-1 und GPA-16 [146, 147], sowie LIN-5 [148, 149], die zusammen einen im Kortex verankerten Ternärkomplex bilden [20]. An diesem bindet der molekulare Motor Dynein, welcher schließlich Zugkräfte auf Mikrotubuli generieren kann [143, 144]. Eine Spindelverschiebung bedingt hier notwendigerweise eine Ungleichheit der

von beiden Seiten auf die Spindel wirkenden Kräfte. Mit Laser-Ablationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die wirkenden Kräfte von posteriorer Seite etwa 1,5 mal so groß sind wie die von anteriorer Seite. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich posterior mehr Kraftgeneratoren (Ternärkomplex + Dynein) als anterior befinden [143, 144].

Die Ungleichheit der Kräfte wird noch von weiteren Faktoren beeinflusst. Das Protein LET-99 ist in einem lateralen Band um den posterioren Pol des Embryos lokalisiert [150] und reduziert dort die Zugkräfte [151]. Dies führt effektiv zu einer Bündelung der wirkenden Kräfte auf die Polarisationsachse. Neben einer höheren Dichte der Kraftgeneratoren im posterioren Teil des Embryos werden die Kräfte auch von anteriorer Seite moduliert. So konnte ein Einfluss vom anterior lokalisierten Protein RGS-7 auf die Bewegung der Spindel nachgewiesen werden [152]. PKC-3 inhibiert LIN-5 im anterioren Teil des Kortex [153] und reduziert somit dort lokal die Zugkräfte. Weiterhin werden die Kräfte von anteriorer Seite durch das dort lokalisierte Protein CSNK-1 reduziert [154].

Wie oben bereits dargelegt wurde, hat der gesamte Mechanismus zur Spindelverschiebung seinen Ursprung im PAR-System. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass sich die Zygote symmetrisch teilt, wenn der gesamte Kortex entweder den anterioren oder posterioren Phänotyp annimmt [143], d.h., eine Polarisierung unterbunden wird. Dies ist durch das Ausschalten von PAR-2 bzw. PAR-3 möglich. Ist der gesamte Kortex vom posterioren Phänotyp, so sind auch die wirkenden Zugkräfte auf die Spindelpole von vergleichbarer Größe wie die auf den posterioren Pol in ungestörten Embryonen. Dies gilt umgekehrt auch für einen Kortex vom anterioren Typ. Interessanterweise reichen in letzterem Fall die wirkenden Kräfte nicht aus, um einen Übergang von der Meta- in die Anaphase hervorzurufen [143].

Insgesamt sind somit die molekularen Vorgänge zur Generation und Regulierung der wirkenden Kräfte in der Zygote P_0 bereits relativ gut, aber keineswegs vollständig erforscht. Für die daraus resultierende Bewegung der Spindel gilt dies nur in geringerem Maße. Die Position der Spindel ist seitens des anterioren Pols so lange fixiert, bis sie komplett assembliert ist, d.h., die Metaphasen-Platte aufgebaut ist. Erst dann wird die Fixierung gelöst und eine Spindelverschiebung kann stattfinden [155]. Während der Verschiebung der Spindel erfährt der anteriore Pol nur einen kleinen posterioren Versatz [155], der posteriore Pol hingegen wird um einige μm in posteriore Richtung verschoben [146]. Die Verschiebung der Metaphasen-Platte (und damit der Ebene der Cytokinese) ist somit Resultat einer Dehnung der gesamten Spindel. Es ist bisher allerdings nicht bekannt, ob die Bewegung der Spindelpole in einer Gleichgewichtsposition endet, oder ob die Zelle noch während der Polbewegung direkt in die Anaphase eintritt. Ferner wurde die absolute Distanz der Verschiebung der Metaphasen-Platte bisher nicht explizit bestimmt. Selbiges gilt für die daraus resultierenden Teilungsverhältnisse, d.h. die Volumenverhältnisse der Tochterzellen. Diese Aussage gilt für alle Zellen, also auch somatische. Des Weiteren fanden alle bisher publizierten Experimente ausschließlich in der Zygote statt. Über das Verhalten der Spindel in P_1 bis P_3 ist daher nichts bekannt. Erkenntnisse über die Vorgänge in diesen Zellen können Aufschlüsse über den Einfluss der Zellgröße auf die Spindelverschiebung geben.

Offene Fragen

Wie im vorangegangenen Abschnitt klar wurde, sind bezüglich geometrisch asymmetrischer Zellteilungen noch viele Aspekte unerforscht. An dieser Stelle sollen einige Fragestellungen konkret aufgeworfen und im Folgenden beantwortet werden.

- Wie sind die Teilungsverhältnisse der frühen somatischen Zellteilungen? Falls somatische Zellen Asymmetrien zeigen, wodurch werden diese verursacht?
- Wie sind die Teilungsverhältnisse der Zellteilungen in der Keimbahn, d.h. bei P_0 bis P_3 ?
- Kann eine Spindelverschiebung detektiert werden, welche die Asymmetrie der Zellteilungen bei P_1 bis P_3 begleitet? Wie muss diese mit der Zellgröße skalieren, um die Teilungsverhältnisse zu erklären?
- Endet die Spindelverschiebung bei Keimbahnzellen in einer Gleichgewichtsposition, bevor die Zelle in die Anaphase eintritt?
- Können die Daten mit einem einfachen Modell erklärt werden?

3.3.2. Ergebnisse

An dieser Stelle werden die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich volumetrisch asymmetrischer Zellteilungen vorgestellt. Das Kapitel ist dabei wie folgt untergliedert: Zuerst werden die Asymmetrien in ungestörten Embryonen gemessen. Anhand der Asymmetriemessung in Embryonen ohne starre Eihülle und der Messung der Spindelposition während der Metaphase kann daraufhin gezeigt werden, dass auftretende Asymmetrien in somatischen Zellen wahrscheinlich Folge geometrischer Randbedingungen und nicht zellintern vorgegeben sind. Daraufhin wendet sich der Fokus den Zellen der Keimbahn zu. Hier kann anhand theoretischer Überlegungen und experimenteller Messungen gezeigt werden, dass die exzentrische Spindelverschiebung während der Metaphase unabhängig von der Zellgröße ist. Nach zusätzlichen Messungen in der Zygote P_0 zur Art der Spindelverschiebung wird schließlich ein Modell entwickelt, welches die Entkopplung von Zellgröße und Spindelverschiebung rationalisiert.

Zur Erstellung dieses Kapitels wurden ausschließlich Daten der Linie OD95 bei 22,5 °C verwendet.

Etwa 40% aller frühen Zellen teilen sich asymmetrisch

Zuerst werden die geometrischen Asymmetrien der Zellteilungen während der frühen Embryogenese, d.h. bis zur Gastrulation, quantifiziert. Hierfür werden die gemäß Kap. 3.2 bestimmten Zellvolumina verwendet. Um die geometrische Asymmetrie einer Zellteilung zu quantifizieren, wird das Teilungsverhältnis

$$TV = \frac{V_1}{V_2} \tag{3.2}$$

mit den Tochterzellvolumina $V_{1/2}$ definiert. Per Konvention wird bei somatischen Zellteilungen für V_2 das Volumen der posterioren Tochterzelle verwendet (so ist z.B. $TV_{AB} = V_{ABa}/V_{ABp}$), bei Teilungen der P -Linie das der neuen P -Zelle (z.B. $TV_{P_2} = V_C/V_{P_3}$). Ein Wert $TV = 1$ entspricht einer symmetrischen Teilung, Abweichungen deuten auf eine Asymmetrie hin.

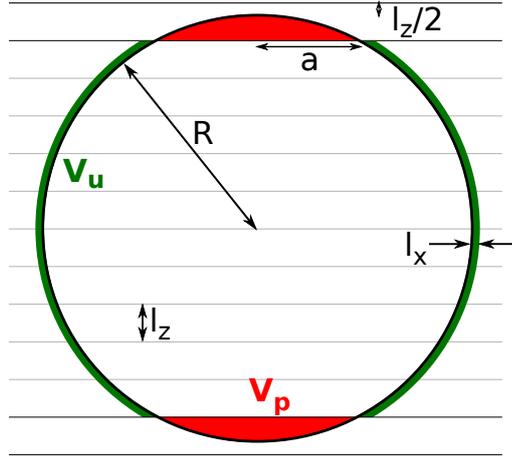


Abbildung 3.7.: Abschätzung des nicht signifikanten Bereiches der Teilungsverhältnisse. Die Zellen werden hierzu als sphärisch angenommen. Zur Abschätzung des maximalen Fehlers bei der Volumenbestimmung werden die potentiellen Fehler in der obersten und untersten Bildebene geschätzt (V_p) sowie der Fehler in allen Ebenen dazwischen (V_u). Zur Abschätzung von V_u und V_p siehe Text.

Die gemessenen Zellvolumina sind fehlerbehaftete Größen. Folglich werden auch bei vollkommen symmetrischen Teilungen für TV Werte erwartet, die von eins abweichen. Aus diesem Grund wird eine Schwelle definiert, die von TV überschritten werden muss, damit die Teilung als asymmetrisch klassifiziert wird. Die Bestimmung dieses nicht signifikanten Bereiches erfolgt dabei anhand fundamentaler Überlegungen bezüglich der Segmentierung, und nicht etwa anhand der Varianz der gemessenen Volumen. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass potentiell jede einzelne Messung diesen fundamentalen Fehlern unterworfen ist. Somit können alle Werte systematisch vom wahren Volumen abweichen. Der nicht signifikante Bereich soll also die prinzipiell erreichbare Genauigkeit abschätzen.

Die folgenden Überlegungen sind in Abb. 3.7 schematisch dargestellt. Der größte Fehler während der Segmentierung rührt von der Entscheidung her, ob eine weitere Voxelschicht der bereits segmentierten Region hinzugefügt wird oder nicht. Der Einfachheit halber werden alle Zellen im Folgenden als sphärisch angenommen (aufgrund des *mitotic cell rounding* ist dies zumindest während der Mitose eine hinreichend gute Näherung, vgl. Kap. A.2). Aus dem Zellvolumen V kann in diesem Fall der Zellradius gemäß $R = (3V/4\pi)^{1/3}$ berechnet werden, so dass für den Fehler ΔV ein analytischer Ausdruck abgeleitet werden kann. Wegen der Voxelabmessungen $l_z \gg l_x$ müssen die oberste und unterste Ebene des Bildstapels, in welchen die Zelle vorhanden ist, separat behandelt werden. Im Mittel wird die Zellmembran diese beiden Ebenen etwa in der Mitte schneiden, d.h., die Ebenen enthalten Kugelsegmente der Höhe $h = l_z/2$. Der Radius des Basiskreises a errechnet sich gemäß $a^2 = R^2 - (R - h)^2$. Daraus ergibt sich der Fehler in diesen beiden Ebenen zu

$$V_p = 2 \cdot \frac{\pi h}{6} (3a^2 + h^2) = \pi l_z (Rl_z - l_z^2/6). \quad (3.3)$$

Der Beitrag V_u der inneren Ebenen (allen außer der obersten und untersten) zum Gesamtfehler ΔV kann als Kugelschale der Dicke l_x , d.h. der Breite eines Voxels, abzüglich der Kugelkalotten in der obersten und untersten Ebene ausgedrückt werden,

$$V_u = 4\pi R^2 l_x - 2\pi R l_z l_x. \quad (3.4)$$

$V_p + V_u$ entspricht als Volumen einer bestimmten Anzahl an Voxeln, die der Region fälschlicherweise (nicht) hinzugefügt wurden. Die Wahrscheinlichkeit, ein Voxel am Rand der

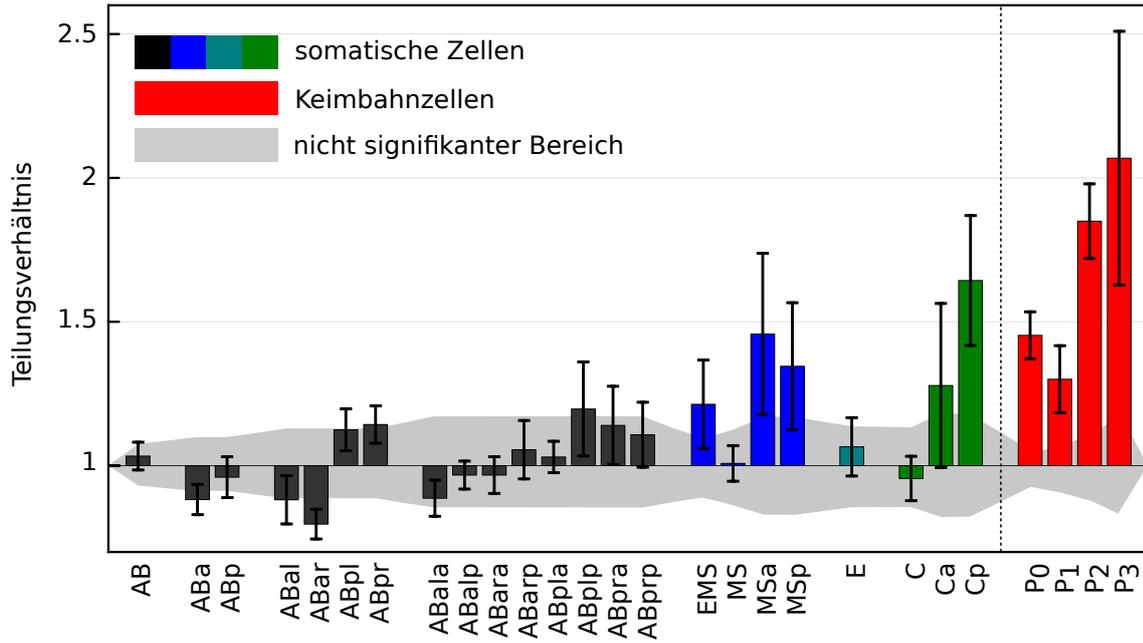


Abbildung 3.8.: Geometrische Asymmetrien der Zellteilungen in ungestörten Embryonen. Gezeigt sind die Volumenverhältnisse TV der Tochterzellen der benannten Mutterzellen, gruppiert nach Zelllinien. Balken entsprechen Medianwerten von $n = 10$ Embryonen, Fehlerbalken den Standardabweichungen. Der (volumenabhängige) nicht signifikante Bereich (grau, nach Gl. 3.6) quantifiziert TV -Werte, die alleine Segmentierungsfehlern attribuiert werden. Alle Zellteilungen mit TV -Werten innerhalb dieses Bereiches werden daher als symmetrisch interpretiert. Folglich teilen sich alle P -Zellen, aber auch einige Zellen der somatischen Linien, insbesondere der MS - und C -Linie, signifikant asymmetrisch.

Region falsch zu klassifizieren, wird zu 50% abgeschätzt. Damit folgt für den zu erwartenden Fehler bei der Volumenbestimmung

$$\Delta V = \frac{1}{2}(V_p + V_u). \quad (3.5)$$

Die obigen Überlegungen gelten sowohl für eine Unterschätzung des tatsächlichen Volumens, d.h., Voxel wurden der Region fälschlicherweise nicht hinzugefügt, als auch für eine Überschätzung, bei der der Region zu viele Voxel hinzugefügt wurden.

Infolge dessen kann die symmetrische Teilung einer Zelle des Volumens V_m im schlechtesten Fall zu beobachteten Teilungsverhältnissen

$$TV_{max} = \frac{V_m/2 + \Delta V}{V_m/2 - \Delta V} \quad \text{und} \quad TV_{min} = \frac{V_m/2 - \Delta V}{V_m/2 + \Delta V} \quad (3.6)$$

führen. Aufgrund der nichtlinearen Abhängigkeit von ΔV vom Zellvolumen sind TV_{max} und TV_{min} nicht konstant, sondern steigen mit sinkendem Zellvolumen. Somit können in größeren Zellen bereits geringe Asymmetrien signifikant detektiert werden, während dies in kleinen Zellen nicht ohne Weiteres möglich ist.

Die gemessenen Teilungsverhältnisse der frühesten Zellen in ungestörten Embryonen sowie der nicht signifikante Bereich nach Gl. 3.6 sind in Abbildung Abb. 3.8 dargestellt. Für die Werte von TV werden die Medianwerte der Teilungsverhältnisse von $n = 10$ Embryonen verwendet. Im Vergleich zur Verwendung des arithmetischen Mittelwerts werden durch den Median grobe Ausreißer (durch abnormes Verhalten eines Embryos) effektiv unterdrückt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Auf eine Bestimmung

der Asymmetrien der fünften *AB*-Generation wird verzichtet. Zwar wurden die Volumina bis zur sechsten *AB*-Generation gemessen, so dass eine Bestimmung möglich wäre, allerdings wird der nicht signifikante Bereich bei diesen kleinen Volumina so groß, dass eine Auswertung wenig aussagekräftig ist.

Die Teilungen der *P*-Zellen sowie die von *EMS* werden in der Literatur als geometrisch asymmetrisch beschrieben [20, 31, 132]. Die Teilungen der Keimbahnzellen P_0 bis P_3 zeigen tatsächlich signifikante Asymmetrien, allerdings mit deutlich unterschiedlichen *TV*-Werten. *EMS* teilt sich ebenfalls asymmetrisch, jedoch mit einem kleineren *TV*.

Neben diesen Teilungen zeigten überraschenderweise auch weitere somatische Zellen signifikant von eins abweichende Teilungsverhältnisse. Dies trifft vor allem auf die Zellen *MSa*, *MSp*, *Ca* und *Cp* zu, deren Töchter sich im Volumen zwischen 30% und 60% unterscheiden ($1,3 \lesssim TV \lesssim 1,6$). Demgegenüber stehen die nahezu vollkommen symmetrischen Zellteilungen der Zellen *E*, *MS* und *C* in der vorangegangenen Zellgeneration. Die meisten Zellen der *AB*-Linie teilten sich symmetrisch. Allerdings gab es auch hier signifikante Ausnahmen, wobei *ABa* und *ABar* hervorzuheben sind. Weitere Zellen dieser Linie (*ABal*, *ABpl*, *ABpr* und *ABplp*) sind an der Grenze des signifikanten Bereichs, so dass eine Klassifizierung als asymmetrische Teilung nicht mit Sicherheit möglich ist.

Insgesamt kann somit bei etwa 40% aller Zellteilungen bis zur Gastrulation eine signifikante Asymmetrie der Tochterzellvolumina festgestellt werden.

Die starre Chitinhülle beeinflusst Asymmetrien somatischer Zellen

Eine biochemische Polarisierung der Zellen *MSa*, *MSp*, *Ca* und *Cp* sowie der Zellen der *AB*-Linie entlang der Teilungsachse ist nicht bekannt. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten geometrischen Asymmetrien zumindest zu einem Teil auf mechanische Zwänge ausübende Randbedingungen, d.h. benachbarte Zellen sowie die starre Eihülle, zurückzuführen sind. In den letzten Jahren wurde der Einfluss geometrischer Randbedingungen auf biologische Prozesse immer deutlicher. Während in *C. elegans* die Zellanordnung durch Kräfte, die auch von der Eihülle hervorgerufen werden, erklärt werden kann (siehe Kap. 1.1.4 und Kap. 3.1.2, [2]), spielen solche Effekte z.B. auch bei der Gewebeorganisation eine wichtige Rolle [156, 157].

Aus diesem Grund wird der Einfluss der starren Chitinhülle auf die Asymmetrie der Zellteilungen untersucht. Die Entwicklung von insgesamt $n = 11$ Embryonen ohne Chitinhülle wurde aufgenommen und ausgewertet (zur Entfernung der Chitinhülle siehe Kap. 2.1). Die EEM/Vitellinschicht wurde aus zwei Gründen nicht entfernt. Erstens fungiert diese als Permeabilitätsbarriere, so dass keine Kontrolle der Osmolarität des umgebenden Mediums nötig ist. Hierdurch ist ein Volumenerhalt der Zellen sichergestellt. Zweitens stellt die Vitellinschicht sicher, dass die Zellanordnung der in ungestörten Embryonen beobachteten in den meisten Fällen ähnlich ist. Somit treten auch die meisten Zellkontakte weiterhin auf (siehe Kap. 3.1.2 und Diskussion). Die EEM/Vitellinschicht ist im Vergleich zur Chitinhülle deutlich flexibler, so dass sie von Zellen lokal deformiert werden kann, wodurch potentielle Zwänge während der Zellteilung abgeschwächt werden (siehe hierzu auch Kap. 3.1.2, insbesondere Abb. 3.2b).

Die aus diesen Daten extrahierten Teilungsverhältnisse *TV* sind in Abb. 3.9a aufgetragen. Abb. 3.9b zeigt einen direkten Vergleich der Werte mit jenen ungestörter Embryonen. Wie man erkennt, zeigen die meisten somatischen Zellen eine Tendenz zu sinkenden Asymmetrien. *EMS*, *MSa*, *MSp*, *Cp* und *ABa* teilen sich, ebenso wie die Grenzfälle *ABpl* und *ABplp* deutlich weniger asymmetrisch als im ungestörten Fall. Die Asymmetrien von *EMS*, *MSp* und der drei genannten Zellen der *AB*-Linie fallen sogar unter den Schwellwert der Signifikanz, so dass sie nun als symmetrisch klassifiziert werden. Andere Zellen

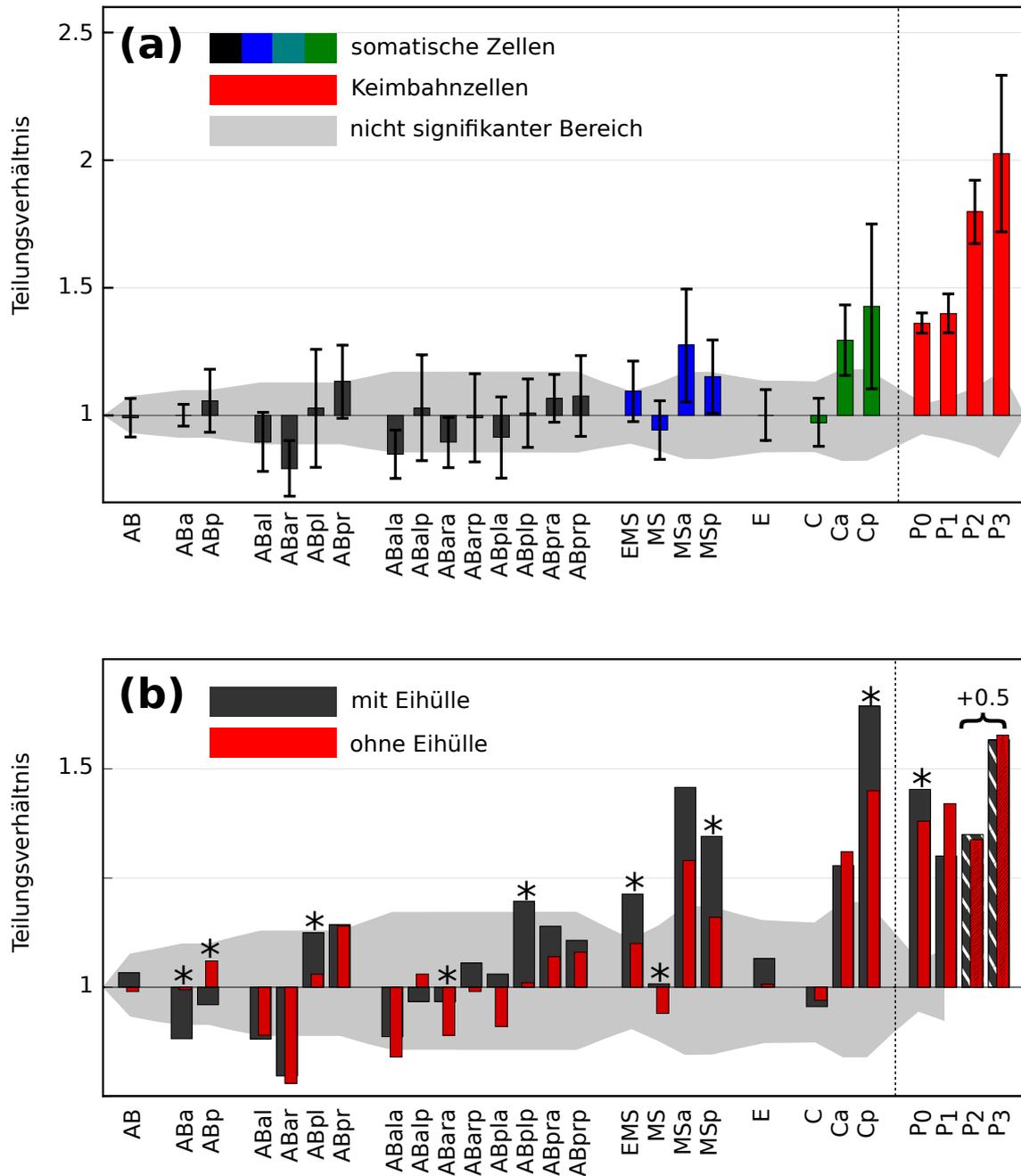


Abbildung 3.9.: Geometrische Asymmetrien der Zellteilungen in Embryonen ohne starre Eihülle. (a) Aufgetragen sind die Teilungsverhältnisse der benannten Zellen in Embryonen ohne starre Chitinhülle. Balken entsprechen Medianwerten von $n = 11$ Embryonen, Fehlerbalken den Standardabweichungen. Zur Definition des nicht signifikanten Bereichs siehe Text und Abb. 3.8. (b) Direkter Vergleich der TV -Werte von ungestörten Embryonen (schwarz) und solchen ohne Chitinhülle (rot). Zur besseren Übersicht wurden die Fehlerbalken weggelassen und die TV -Werte der beiden Zellen P_2 und P_3 um 0,5 reduziert. Während sich die TV -Werte der Keimbahnzellen kaum ändern, zeigen viele somatische Zellen eine klare Tendenz zu sinkenden Werten, wenn die starre Hülle entfernt wird. Sternchen markieren signifikante Unterschiede in den Verteilungen der Asymmetrien (Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test, $p < 0,1$).

zeigen kaum eine Änderung ihrer Asymmetrien. Dazu zählen *ABal*, *ABar*, *ABala* sowie *Ca*. *ABar* und *Ca* müssen immer noch als sich asymmetrisch teilend klassifiziert werden.

Zur Bewertung der Signifikanz der Änderungen können die Verteilungen im ungestörten Fall mit jenen in Embryonen ohne starre Eihülle verglichen werden. Hierfür wird ein Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet. An die zugrunde liegenden Wahrscheinlichkeitsverteilungen werden dabei keine Voraussetzungen gestellt. Da die tatsächliche Verteilung der Asymmetrien in den Ensembles der untersuchten Embryonen nicht bekannt ist, ist der KS-Test hier z.B. dem T-Test, welcher von normalverteilten Zufallsvariablen ausgeht, vorzuziehen. Die Nullhypothese (die Asymmetrien in beiden genannten Fällen entstammen derselben Verteilung) wird bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,1$ verworfen. Solche signifikanten Unterschiede sind in Abb. 3.9b mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die meisten angesprochenen Verringerungen der Asymmetrie in somatischen Zellen sind in der Tat signifikant. Allerdings zeigt z.B. *MSa* eine deutlich verringerte Asymmetrie, ohne dass der Test die Nullhypothese verwirft. Hierzu ist anzumerken, dass bei kleinen Stichproben ($n \approx 10$ in diesem Fall) die Teststärke relativ klein ist, es folglich oft zu Fehlern zweiter Art kommen kann. Solche Fehler bezeichnen die Annahme der Nullhypothese, obwohl die verglichenen Datenpunkte unterschiedlichen Verteilungen entspringen. Daher kann aus einer Annahme der Nullhypothese nicht geschlossen werden, dass die zugrunde liegenden Verteilungen tatsächlich gleich sind. Umgekehrt bedeutet ein Verwerfen der Nullhypothese unter einem gegebenen Signifikanzniveau α jedoch, dass sich die Verteilungen mit einer Wahrscheinlichkeit von $1 - \alpha$ tatsächlich unterscheiden, unabhängig von der Stichprobengröße.

Die Asymmetrien der *P*-Linie ändern sich nur wenig. Die *TV*-Werte von P_0 und P_1 weichen geringfügig von den ungestörten ab, während P_2 und P_3 nahezu keine Änderung zeigen. Die einzige signifikante Änderung tritt dabei in der Zygote P_0 auf, wo sich die beobachtete Asymmetrie in Embryonen ohne starre Eihülle verringert. Die Zellform der Zygote unterscheidet sich stark in ungestörten Embryonen und solchen ohne Chitinhülle, bei welchen sie deutlich runder ist. Dies kann eventuell zu einem geänderten Teilungsverhältnis beitragen.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die starren Randbedingungen durch die Chitinhülle signifikanten Einfluss auf die beobachteten Asymmetrien der somatischen Zellteilungen haben. Einige Asymmetrien gehen bis in den nicht signifikanten Bereich zurück, andere sind deutlich reduziert. Bei manchen somatischen Zellen ändert sich die Asymmetrie nicht, wobei hier besonders *Ca* zu nennen ist. Dennoch deuten die Ergebnisse für die meisten somatischen Zellen darauf hin, dass die geometrischen Asymmetrien wie anfangs vermutet durch mechanische Zwänge verursacht werden. Die Asymmetrien der Keimbahnzellen hingegen verändern sich kaum (von der Zygote abgesehen). Diese scheinen also in der Tat, wie in der Einleitung dargelegt, durch interne Vorgänge bestimmt zu sein.

Asymmetrien in somatischen Zellen entstehen nicht durch exzentrische Spindelpositionen

Wie soeben dargelegt wurde liefert die Entfernung der starren Chitinhülle starke Hinweise darauf, dass die beobachteten Asymmetrien bei den somatischen Zellteilungen zumindest zum Teil eine Folge sterischer Randbedingungen sind. Die Asymmetrien verschwinden in den meisten Fällen jedoch nicht vollständig, in einigen bleiben sie unverändert. Wie in Kapitel 3.3.1 bereits erörtert wurde, zeichnet sich eine biochemisch verursachte geometrische Asymmetrie der Zellteilung i.A. durch eine Verschiebung der mitotischen Spindel entlang der Polarisationsachse aus, wie dies z.B. in der Zygote P_0 der Fall ist. Falls also die verbleibenden Asymmetrien der somatischen Zellteilungen in Embryonen ohne starre Eihülle

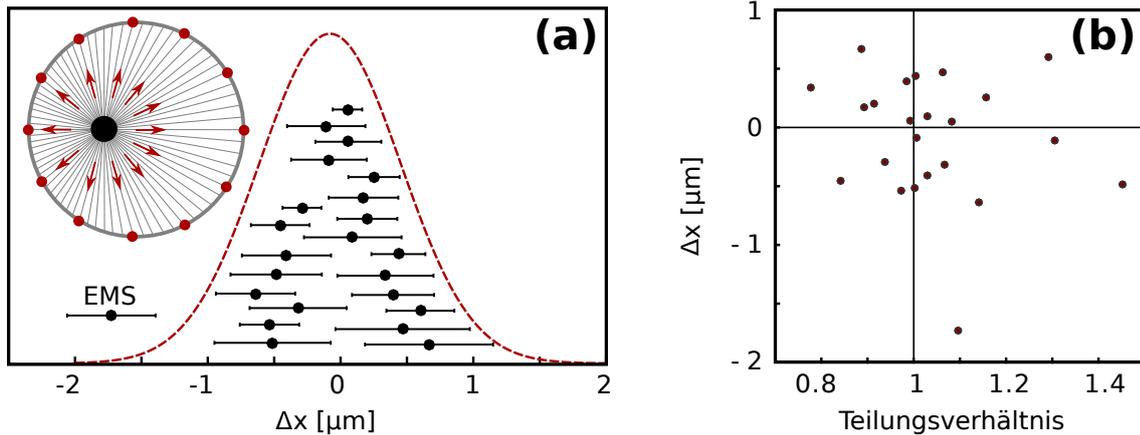


Abbildung 3.10.: Spindelverschiebungen somatischer Zellteilungen. (a) Gezeigt sind die Abstände der Spindelschwerpunkte vom Zellzentrum entlang der Teilungsachsen, Δx , für die frühesten 23 somatischen Zellen (Median + Standardfehler von $n = 11$ Embryonen ohne starre Eihülle, schwarze Punkte). Die Werte folgen etwa einer Normalverteilung mit dem Mittelwert $\langle \Delta x \rangle = -0,08 \mu\text{m}$ und der Standardabweichung $\sigma_{\Delta x} = 0,53 \mu\text{m}$ (gestrichelte rote Linie). Einziger Ausreißer ist die Zelle *EMS*. **Einfügung:** Die Bestimmung des Zellzentrums als Referenzpunkt erfolgte mittels eines Zentrierungsmechanismus, der von Grill und Hyman vorgeschlagen wurde [15, 16]. Hierbei üben im Kortex gleichverteilte Kraftgeneratoren (rote Punkte) längenunabhängige Kräfte (rote Pfeile) auf astrale Mikrotubuli (graue Linien) aus. Dies führt effektiv zu einer zentrierenden Kraft auf die Spindel (im gezeigten Fall nach rechts, Details siehe Text). (b) Die Spindelverschiebungen Δx zeigen keine erkennbare Korrelation mit den beobachteten Asymmetrien der Teilungen. Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Merkmalen beträgt $-0,17$.

sterisch und nicht biochemisch induziert sind, sollte eine solche Spindelverschiebung nicht konsistent existieren. Die Spindeln wären in diesem Fall nahe des Zentrums der Zellen.

Um diese Vorhersage zu testen werden die jeweils letzten Bildstapel S_0 verwendet, die die jeweilige Zelle eindeutig in der Metaphase zeigen. In diesen Bildstapeln wird das Zentrum C der Zelle anhand der Segmentierungsergebnisse berechnet (siehe nächster Absatz). Aus dem Tracking der Zellkerne kann die Position der Metaphasen-Platte r_0 sowie die Teilungsachse d (mittels der nächsten drei Bildstapel S_1, \dots, S_3) ausgelesen werden. Als Messgröße dient hier der Abstand der Metaphasen-Platte zum Zellzentrum entlang der Teilungs- bzw. Polarisationsachse.

Das Zentrum der Zelle als geometrischer Ort ist nur unzureichend definiert. In nahezu allen Publikationen, die sich mit Zentrierungsmechanismen der Spindel auseinandersetzen, ist schlicht vom “Zentrum” in meist runden/sphärischen Zellen die Rede, ohne auf die geometrischen Eigenschaften dieses Punktes näher einzugehen [15, 130, 137, 139, 158]. Aus diesem Grund wird ein von Grill und Hyman vorgeschlagener Mechanismus verwendet, um das Zentrum der Zelle anhand der Membransegmentierung numerisch und iterativ zu bestimmen [15, 16] (siehe Abb. 3.10a, Einfügung). Bei diesem Mechanismus ist die Spindel durch astrale Mikrotubuli mit dem Kortex verbunden. Auf dem Kortex befindet sich eine begrenzte Anzahl sog. kortikaler Kraftgeneratoren (*cortical force generators*), die auf andockende Mikrotubuli längenunabhängige Zugkräfte ausüben. Essentiell ist hierbei die Forderung, dass die Kraftgeneratoren auf dem Kortex räumlich gleichverteilt sind. Falls die Zahl der Mikrotubuli die der Kraftgeneratoren übersteigt, so dass von einer gesättigten Besetzung der Generatoren ausgegangen werden kann, führt der beschriebene Mechanismus zu einer Zentrierung der Spindel.

Bei der Implementierung dieses Mechanismus werden auf der Oberfläche der segmentierten Zelle 3000 Voxel ausgewählt. Um eine möglichst homogene Verteilung dieser Punkte auf

der Zelloberfläche zu erreichen, wird dabei mit einer deutlich höheren Zahl (z.B. 9000) zufällig ausgewählter Voxel gestartet. Nun werden iterativ diejenigen Voxel entfernt, die den aktuell kürzesten Abstand zu einem Nachbarn haben. Dies geschieht so lange, bis nur noch 3000 Voxel übrig sind. Die (Objektraum-) Koordinaten dieser Voxel, \mathbf{p}_i , $i = 1, \dots, 3000$, dienen im Folgenden als Positionen der Kraftgeneratoren. Um Abweichungen dieser Positionen von einer Gleichverteilung gering zu halten, wurde ihre Anzahl entsprechend hoch gewählt (3000). Mittels der \mathbf{p}_i wird nun das Zellzentrum iterativ bestimmt. Als Startpunkt \mathbf{c}_0 wird der Schwerpunkt der \mathbf{p}_i verwendet. Die während der Iteration j wirkende effektive Kraft \mathbf{F}_j auf \mathbf{c}_j lässt sich berechnen zu $\mathbf{F}_j = \sum_i (\mathbf{c}_j - \mathbf{p}_i) / |\mathbf{c}_j - \mathbf{p}_i|$. Die Summe läuft dabei über alle Koordinaten \mathbf{p}_i . Aus der Kraft ergibt sich die neue Position \mathbf{c}_{j+1} gemäß $\mathbf{c}_{j+1} = \mathbf{c}_j + \epsilon \mathbf{F}_j$. Hierbei ist ϵ eine kleine, empirische Konstante. Nach etwa 200 Iterationen konvergiert \mathbf{c} und ändert sich nicht mehr. Da die finale Lage von \mathbf{c} von den \mathbf{p}_i abhängt und diese zufällig bestimmt werden, sind die Ergebnisse nicht deterministisch. Aus diesem Grund wird die geschilderte Berechnung für jede Zelle fünf mal ausgeführt, wobei die \mathbf{p}_i jedes mal neu generiert werden. Als Zellzentrum \mathbf{C} wird der Mittelwert aus den fünf erhaltenen \mathbf{c} verwendet.

Das mit dem beschriebenen Vorgehen erhaltene Zentrum ist nicht mit dem Schwerpunkt der Zelle oder dem Schwerpunkt der Plasmamembran identisch, wie dies naiv erwartet werden könnte. Stattdessen weicht der Ort von beiden um bis zu einigen μm ab, wenn die Zelle keine regelmäßige Form aufweist. Für sphärische Zellen stimmen alle drei Punkte überein.

Neben dem Zentrum \mathbf{C} müssen der Schwerpunkt \mathbf{r}_0 und die Orientierung \mathbf{d} der Spindel bestimmt werden. \mathbf{d} entspricht hierbei der Teilungsachse. \mathbf{r}_0 ist aus dem Tracking des Histonkanals der Aufnahme direkt bekannt (siehe Kap. 2.2.1). Die Teilungsachse wird ebenfalls aus dem Nukleitracking abgeschätzt. Hierzu werden die Positionen \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 der beiden Tochterchromatid-Ansammlungen in den drei auf S_0 folgenden Bildstapeln (S_1 bis S_3) herangezogen. Als Teilungsachse wird der Mittelwert der drei normierten Verbindungsvektoren verwendet,

$$\mathbf{d} = \langle (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) / |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2| \rangle. \quad (3.7)$$

Es hat sich herausgestellt, dass dies eine vertrauenswürdige Schätzung für die Teilungsachse ist. Die Zuordnung von $\mathbf{r}_{1/2}$ auf die Zellen entspricht dabei der zur Bestimmung von TV verwendeten Konvention, d.h., \mathbf{r}_1 entstammt der anterioren, \mathbf{r}_2 der posterioren Tochterzelle.

Aus den drei Größen \mathbf{C} , \mathbf{r}_0 und \mathbf{d} kann nun der Versatz Δx zwischen Spindel und Zellzentrum längs der Teilungsachse gegen Ende der Metaphase berechnet werden. Dieser ergibt sich zu

$$\Delta x = \mathbf{d} \cdot (\mathbf{C} - \mathbf{r}_0) \quad (3.8)$$

Die Projektion des Abstandes $\mathbf{C} - \mathbf{r}_0$ auf die Teilungsachse ist hier nötig, da eine Verschiebung der Spindel senkrecht zur Teilungsachse keine Auswirkung auf die Asymmetrie der Teilung hat (eine solche Verschiebung liegt in der durch die Spindel induzierte Ebene der Cytokinese und ändert diese daher nicht [18]). Aufgrund der Definition von Gl. 3.8 sollte eine für die Asymmetrie ursächlich verantwortliche Spindelverschiebung positiv sein, wenn $TV > 1$, und negativ, wenn $TV < 1$.

Die Verschiebung Δx wird für alle 23 somatischen Zellen, die in Abb. 3.9 vorhanden sind, in allen untersuchten Embryonen ohne Eihülle berechnet. Die Medianwerte und Standardfehler dieser Ensembles sind für alle 23 Zellen in Abb. 3.10a gezeigt. Der Median wurde auch hier zur Unterdrückung grober Ausreißer, etwa durch fehlerhafte Segmentierung,

verwendet. Weiterhin werden hier Standardfehler anstelle von Standardabweichungen verwendet, da Messfehler (v.a. Positionsungenauigkeiten beim Tracking, vgl. Kap. 2.2.1) von derselben Größenordnung erwartet werden wie tatsächliche Schwankungen der Spindelverschiebungen in verschiedenen Embryonen.

Mit Ausnahme von *EMS* liegen die Spindelverschiebungen aller Zellen etwa im Intervall $-0,5 \mu\text{m} \lesssim \Delta x \lesssim 0,5 \mu\text{m}$. Für *EMS* wird eine Verschiebung von etwa $-1,7 \mu\text{m}$ detektiert (siehe unten). Als Mittelwert (incl. *EMS*) ergibt sich $\langle \Delta x \rangle = -0,08 \mu\text{m}$, die Standardabweichung ist $\sigma_{\Delta x} = 0,53 \mu\text{m}$. Die mittlere Abweichung der Spindelposition vom Zellzentrum ist folglich kleiner als die Breite eines Voxels ($l_x = 0,16 \mu\text{m}$). Ein Kolmogorow-Smirnow-Lilliefors-Test, der eine Stichprobe auf Verträglichkeit mit einer (unbestimmten) Normalverteilung prüft, liefert $p > 0,5$, d.h. die Δx sind mit hoher Wahrscheinlichkeit normalverteilt. Mittels eines Einstichproben-T-Tests kann getestet werden, ob die normalverteilten Δx mit einer Verteilung mit Mittelwert Null verträglich sind. Auch hier wird die Nullhypothese nicht verworfen ($p = 0,48$).

Die beschriebene Analyse liefert folglich weitere Hinweise darauf, dass die beobachteten Asymmetrien in den somatischen Zellen nicht durch eine interne biochemische Polarisierung mit anschließender Spindelverschiebung hervorgerufen werden. Dies wird durch die Korrelation der Δx mit den Asymmetrien *TV* weiter bestärkt. In Abb. 3.10b sind die Δx gegen *TV* aufgetragen. Wie bereits dargelegt wurde, sollte sich hier eine positive Korrelation zeigen, falls Spindelverschiebungen die Asymmetrien hervorrufen. Ein solcher Trend kann allerdings nicht festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen Δx und *TV*, berechnet mit allen 23 Zellen, ist klein und beträgt $-0,17$.

Oben wurde bereits auf den großen bei der Zelle *EMS* detektierten Wert der Spindelverschiebung hingewiesen. Dieser ist der einzige grobe Ausreißer aller 23 untersuchten Zellen. Wie im vorangegangenen Unterkapitel gezeigt wurde, geht die geometrische Asymmetrie der Teilung von *EMS* auf einen nicht signifikanten Wert zurück, wenn die starre Eihülle entfernt wird. Ein möglicher Grund für die trotzdem gemessene, recht große Verschiebung Δx in dieser Zelle ist deren Form. Bevor *EMS* in die Mitose eintritt, wird sie von ihren drei Nachbarzellen in eine platte Form gezwungen, die deutlich von allen anderen auftretenden Zellformen während der frühen Embryogenese abweicht (siehe z.B. Abb. 2.4b, mittleres Bild). Dies gilt, zumindest partiell, auch noch nach der Entfernung der Eihülle. Es kann daher spekuliert werden, dass diese gequetschte Form in die Mitose nachwirkt und die Spindelzentrierung stört.

Anhand der Erkenntnisse der letzten beiden Unterkapitel können volumetrische Asymmetrien der somatischen Zellteilungen mit großer Wahrscheinlichkeit sterischen Effekten zugeordnet werden. Dies unterstreicht somit erneut den Einfluss, den geometrische Randbedingungen auf biologische Prozesse ausüben können. Auf Auswirkungen, die sich aus den beobachteten Asymmetrien ergeben, wird in Kap. 3.5 eingegangen.

Konstante Spindelverschiebung erklärt Asymmetrie der Keimbahnzellen quantitativ

Nachdem nun die Asymmetrien der somatischen Zellteilungen ausführlich behandelt wurden, beschäftigt sich der Rest dieses Kapitels mit den asymmetrischen Teilungen der Keimbahnzellen. Da sich diese auch in Embryonen ohne starre Eihülle nur wenig ändern, scheinen sie intern bestimmt zu sein. Um etwaige Einflüsse der starren Hülle so gering wie möglich zu halten, werden für alle Auswertungen des restlichen Kapitels die Aufnahmen von Embryonen ohne starre Eihülle verwendet.

Für die Zygote P_0 wurde eine exzentrische Verschiebung der mitotischen Spindel als Ursache für die geometrische Asymmetrie der Teilung identifiziert [143, 146]. Die Vermutung liegt daher nahe, dass dies auch in den darauf folgenden *P*-Zellen (P_1 bis P_3), die

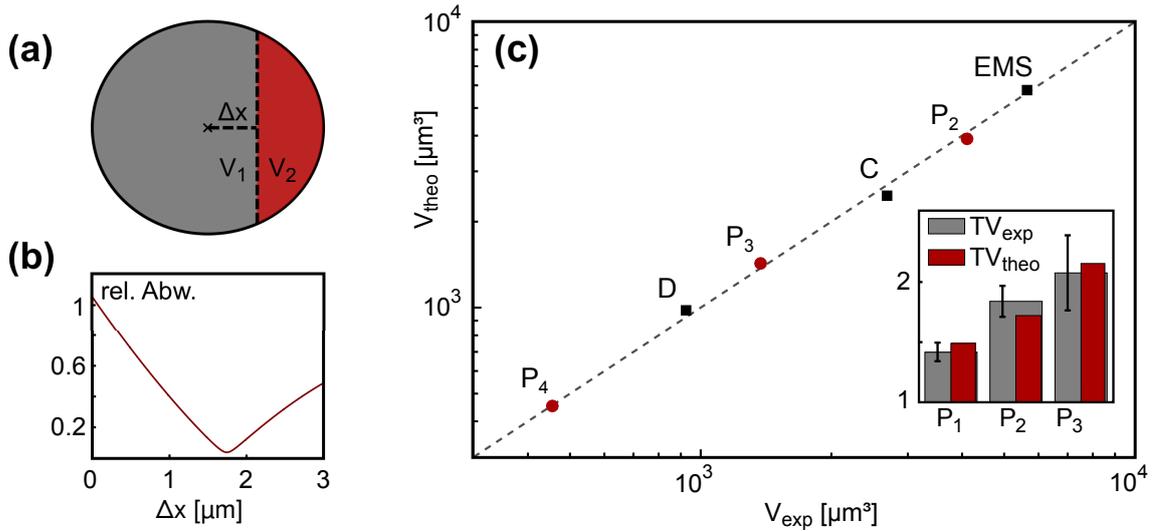


Abbildung 3.11.: Konstante Spindelverschiebung erklärt Asymmetrien der Keimbahnzellen. (a) Zur Abschätzung der benötigten Spindelverschiebung werden die Zellen als sphärisch angenommen und durch eine um Δx aus dem Zentrum heraus verschobene Ebene geteilt. Die beiden entstehenden Kugelsegmente haben die Volumina $V_{1/2}$, welche nach Gl. 3.9 und Gl. 3.10 berechnet werden können. Bei gegebenem Δx können so aus dem gemessenen Volumen von P_1 die Volumina aller Tochterzellen (P_2 bis P_4 , EMS , C & D) berechnet werden. (b) Unter der Annahme einer konstanten, von der Zellgröße entkoppelten Spindelverschiebung Δx ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den vorhergesagten und gemessenen Volumina bei $\Delta x = 1,75 \mu\text{m}$. Die mittlere relative Abweichung der experimentellen und vorhergesagten Volumina aller behandelten Zellen (siehe (a)) ist dort etwa 5%. (c) Vergleich der vorhergesagten Volumina V_{theo} mit den gemessenen V_{exp} aller Tochterzellen von P_1 . Einziger experimenteller Eingabewert zur Berechnung aller V_{theo} war das Volumen von P_1 . $\Delta x = 1,75 \mu\text{m}$. **Einfügung:** Die aus den V_{theo} folgenden Teilungsverhältnisse TV_{theo} stimmen gut mit den experimentell bestimmten TV_{exp} überein.

ebenso biochemisch polarisiert sind [20, 46], der Fall ist. Dabei stellt sich die Frage, wie diese (hypothetische) Verschiebung mit der Zellgröße skalieren müsste, um die Asymmetrien quantitativ zu erklären. Die Zygote P_0 wird von den folgenden Betrachtungen explizit ausgeschlossen, da in ihr einige Proteinspezies die wirkenden Kräfte von anteriorer Seite aus beeinflussen [153, 154]. Bei hinreichend starker Lokalisierung dieser Proteine im Kortex werden sie bei der Teilung von P_0 in die anteriore AB -Zelle segregiert und spielen somit in $P_1 - P_3$ keine (signifikante) Rolle mehr, da auch die Proteinsynthese während der frühen Entwicklung in der Keimbahn weitestgehend ausgeschaltet ist [56]. Die Teilung der Zygote kann also als Spezialfall angesehen werden (siehe unten & Diskussion).

Um die Skalierung der nötigen Spindelverschiebung mit der Zellgröße abzuschätzen, werden im Folgenden die Zellen als sphärisch approximiert. Aufgrund des *mitotic cell rounding* ist diese Näherung während der relevanten Metaphase gut erfüllt (siehe Kap. A.2). In diesem Fall kann aus dem gemessenen Zellvolumen V der zugehörige Radius gemäß $R = (3V/4\pi)^{1/3}$ berechnet werden. Ausgehend hiervon können nun anhand des in Abb. 3.11a skizzierten Schemas die Volumina der Tochterzellen abgeschätzt werden, die aus einer solchen Zelle entstehen, wenn die Spindel um eine Strecke Δx aus dem Zentrum heraus verschoben ist. Da die Spindel die Teilungsebene festlegt [18], würde die Zelle bei diesem Szenario ungefähr in zwei Kugelsegmente der Höhe $R + \Delta x$ bzw. $R - \Delta x$ geteilt. Die Volumina dieser Kugelsegmente ergeben sich zu

$$V_1 = \frac{\pi}{3}(R + \Delta x)^2(2R - \Delta x) \quad (3.9)$$

und

$$V_2 = \frac{\pi}{3}(R - \Delta x)^2(2R + \Delta x) \quad (3.10)$$

(vgl. Abb. 3.11a). Um mittels dieses Schemas die daraus folgenden Teilungsverhältnisse bzw. Zellvolumen zu ermitteln, wurde das experimentell bestimmte Volumen der Zelle P_1 verwendet und in einen Radius umgerechnet. Aus diesem einzelnen Messwert können mit den Gleichungen 3.9 und 3.10 bei einem gegebenen Δx die Zellvolumen V_{theo} aller Tochterzellen von P_1 entlang des Abstammungsbaums (P_2 , EMS , P_3 , C , P_4 und D , siehe Abb. 1.5) vorhergesagt und mit den gemessenen Werten (V_{exp}) verglichen werden: zuerst werden aus dem Radius von P_1 die Volumina von EMS (V_1) und P_2 (V_2) bestimmt. Aus dem vorhergesagten Volumen von P_2 , d.h. V_2 , wird anschließend dessen Radius berechnet, mit welchem die Volumina der Zellen P_3 und C nach demselben Schema bestimmt werden können. Aus dem Volumen von P_3 folgen schließlich die von P_4 und D .

Die einfachste Annahme ist hierbei eine Verschiebung Δx , die nicht von der Zellgröße abhängt, also für alle drei Teilungen konstant ist. In der Tat zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den vorhergesagten und gemessenen Zellvolumina für $\Delta x = 1,75 \mu\text{m}$. Die mittlere Abweichung der V_{theo} von V_{exp} betrug in diesem Fall nur etwa 5% (siehe Abb. 3.11b,c). In Abb. 3.11c sind zudem die aus den V_{theo} folgenden Teilungsverhältnisse abgebildet. Wie zu erkennen ist, sind die Abweichungen von den tatsächlich gemessenen relativ klein und liegen innerhalb der experimentellen Standardabweichung.

Wird für Δx eine Abhängigkeit von der Zellgröße angenommen, z.B. $\Delta x \propto R$ oder $\Delta x \propto V$, so können die experimentellen Daten nicht reproduziert werden. Folglich ist eine konstante, von der Zellgröße entkoppelte Spindelverschiebung $\Delta x = 1,75 \mu\text{m}$ am besten geeignet, um die experimentell beobachteten Teilungsverhältnisse der postzygotischen Keimbahnlinie (P_1 bis P_3) zu erklären.

Bestätigung der konstanten Spindelverschiebung durch SPIM-Aufnahmen

Eine konstante Spindelverschiebung von $\Delta x = 1,75 \mu\text{m}$ sollte in den SPIM-Aufnahmen detektierbar sein. Im Vergleich zur Teilung der Zygote liegen die Teilungsachsen der Zellen P_1 bis P_3 nicht zwingend in einer einzelnen zweidimensionalen Bildebene des SPIM (für den Fall P_0 siehe unten). Dies schließt eine Bestimmung der Spindelverschiebung durch zeitlich hochaufgelöste, zweidimensionale Aufnahmen aus. Da die Teilung typischerweise in mehreren Einzelebenen abgebildet wird, ist zur Auswertung immer ein vollständiger dreidimensionaler Bildstapel nötig. Diese können nicht beliebig schnell aufgenommen werden, da die Aufnahme eines vollen Stapels bereits etwa (7 - 10)s dauert. Aus diesem Grund werden für diese Analyse die Langzeitaufnahmen verwendet, bei welchen die Bildstapel mit einem zeitlichen Abstand von $\Delta T = 30\text{s}$ aufgenommen worden sind.

Zuerst wird die bereits für die somatischen Zellen besprochene Bestimmung des Spindelversatzes bezüglich des Zellzentrums (siehe oben) auch für die Zellen P_1 bis P_3 durchgeführt. Ebenso wie bei den somatischen Zellen werden hierzu die jeweils letzten Stapel verwendet, die die Zellen eindeutig in der Metaphase zeigen. Die Berechnung des Zellzentrums C , der Position der mitotischen Spindel r_0 sowie der Teilungsachse d bleibt dabei ungeändert. Die Ergebnisse (Median + Standardfehler für $n = 11$ Embryonen ohne starre Hülle) sind in Abb. 3.12a dargestellt. Die detektierten Spindelverschiebungen der Zellen P_1 bis P_3 gruppieren sich um einen mittleren Wert von $1,36 \mu\text{m}$, wobei die drei Werte sich nicht signifikant unterscheiden. Ein Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test ergibt, dass die Spindelverschiebungen der Keimbahnzellen nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,27% derselben Verteilung wie die Verschiebungen der somatischen Zellen entstammen. Es ist

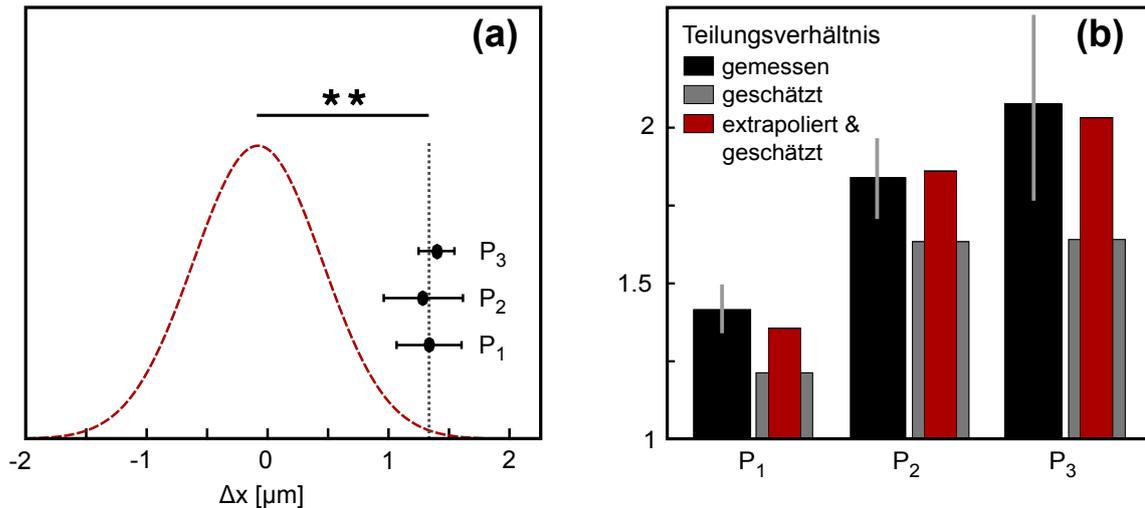


Abbildung 3.12.: SPIM-Aufnahmen bestätigen die zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung. (a) Die Abstände der Spindelschwerpunkte vom Zellzentrum entlang der Teilungsachse sind für die drei Zellen P_1 , P_2 und P_3 im Rahmen des Fehlers gleich (schwarze Punkte, gemessen in den jeweils letzten Aufnahmen in der Metaphase, Fehlerbalken entsprechen Standardfehlern). Der Mittelwert aller drei Verschiebungen ist $1,36 \mu\text{m}$ (gestrichelte schwarze Linie). Der Unterschied zu den Verschiebungen der somatischen Zellen (rote gestrichelte Kurve, vgl. Abb. 3.10a) ist signifikant (Zweistichproben-Kolmogorow-Smirnow-Test, **: $p < 1\%$). (b) Anhand der Position der Spindel in den letzten Bildstapeln, die die Zellen P_1 bis P_3 eindeutig in der Metaphase zeigen, werden deren Teilungsverhältnisse abgeschätzt (graue Balken, siehe Text). Der grobe Trend der experimentell bestimmten Teilungsverhältnisse (schwarze Balken, Fehlerbalken sind Standardabweichungen) wird korrekt wiedergegeben, die Asymmetrie allerdings konsistent unterschätzt. Dies wird auf die lange Zeitspanne zwischen zwei Bildaufnahmen zurückgeführt, in welcher sich die Spindel weiterbewegt. Wird ein unbeobachteter zusätzlicher Spindelversatz von 450 nm in Betracht gezogen, so stimmen experimentelle und geschätzte Teilungsverhältnisse überein (rote Balken, siehe Text).

daher sehr unwahrscheinlich, dass die bei den Keimbahnzellen beobachteten Verschiebungen nur statistische Fluktuationen darstellen.

Die Spindelverschiebung der Keimbahnzellen ist somit tatsächlich signifikant von Null verschieden und unabhängig von der Zellgröße. Allerdings ist der detektierte Wert von $1,36 \mu\text{m}$ deutlich kleiner als die im vorangegangenen Unterkapitel vorausgesagten $1,75 \mu\text{m}$. Dieser Unterschied wird auf den relativ langen zeitlichen Abstand der Bildstapel von $\Delta T = 30 \text{ s}$ zurückgeführt. Zur Auswertung wird der letzte Bildstapel verwendet, der die Zellen klar in der Metaphase abbildet. Dennoch kann sich die Spindel danach noch für bis zu 30 s bewegen, bevor die Anaphase beginnt. In einem Vorgriff auf das nächste Unterkapitel, in dem gezeigt wird, dass sich die Metaphasen-Platte in P_0 mit einer konstanten Geschwindigkeit von etwa 45 nm/s bewegt, wird die Geschwindigkeit der Metaphasen-Platte in P_1 bis P_3 an dieser Stelle auf etwas niedrigere 30 nm/s abgeschätzt (siehe unten für eine Rechtfertigung). Da sich die Spindeln nach obigen Überlegungen *im Mittel* für $\Delta T/2 = 15 \text{ s}$ nach der letzten Aufnahme in der Metaphase weiterbewegen werden, sollte dies zu einer mittleren unbeobachteten Verschiebung von $15 \text{ s} \cdot 30 \text{ nm/s} = 450 \text{ nm}$ bei den Zellen P_1 bis P_3 führen. Die mittlere totale Spindelverschiebung in diesem Fall ist $\Delta x \approx 1,36 \mu\text{m} + 450 \text{ nm} = 1,81 \mu\text{m}$. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den vorhergesagten $1,75 \mu\text{m}$.

Die Beobachtungen können weiter validiert werden, indem die Teilungsverhältnisse TV aus der Position der Spindel abgeschätzt werden. Hierzu werden wieder die jeweils letzten Bildstapel verwendet, die die Zellen P_1 bis P_3 eindeutig in der Metaphase zeigen. Anhand der Spindelposition und -orientierung wird die zu erwartende Teilungsebene, d.h. die

Ebene der Cytokinese, bestimmt und alle Voxel der segmentierten Zelle einer zukünftigen Tochterzelle zugeordnet. Die Voxeluordnung erfolgt dabei anhand der Lage bezüglich der Teilungsebene. Konkret wird hierfür die Position der Metaphasen-Platte \mathbf{r}_0 in zwei (artifizielle) Punkte \mathbf{q}_1 und \mathbf{q}_2 entlang der Teilungsachse \mathbf{d} (siehe oben) gemäß $\mathbf{q}_{1/2} = \mathbf{r}_0 \pm \mathbf{d} \cdot 5 \text{ nm}$ aufgespalten. Der Abstand der beiden Punkte $\mathbf{q}_{1/2}$ von 10 nm wurde so gewählt, dass er numerisch zu stabilen Ergebnissen führt, aber kleiner als eine Voxelbreite ($l_x = 160 \text{ nm}$) ist. Nun werden alle Voxel der segmentierten Zelle in zwei Gruppen geteilt. Diejenigen Voxel, die zu \mathbf{q}_1 einen kürzeren Abstand haben als zu \mathbf{q}_2 werden der Gruppe 1 zugeordnet und umgekehrt. Effektiv wird die Zelle hierdurch in zwei Teilvolumina aufgeteilt. Die Trennebene geht durch \mathbf{r}_0 und steht senkrecht zur Teilungsachse \mathbf{d} . Die Volumen der so gebildeten Voxelgruppen errechnen sich zu $V_{1/2} = N_{1/2} \cdot V_{vox}$ mit der Voxelanzahl $N_{1/2}$ pro Gruppe und dem Voxelvolumen V_{vox} . Diese Berechnung wurde für alle 11 untersuchten Embryonen ohne starre Eihülle durchgeführt. Die Medianwerte sind in Abb. 3.12b abgebildet (graue Balken).

Man erkennt, dass der experimentell beobachtete Trend steigender Asymmetrien mit sinkender Zellgröße in der Tat richtig wiedergegeben wird, die tatsächlichen Teilungsverhältnisse allerdings konsistent unterschätzt werden. Dies ist verträglich mit der ebenfalls unterschätzten Spindelverschiebung von $1,36 \mu\text{m}$ (siehe oben). Werden nun die verwendeten Teilungsebenen wieder um 450 nm in Richtung zukünftiger P -Tochterzelle verschoben ($\mathbf{q}_{1/2} = \mathbf{r}_0 + \mathbf{d} \cdot 450 \text{ nm} \pm \mathbf{d} \cdot 5 \text{ nm}$), so zeigen die damit abgeschätzten Teilungsverhältnisse eine exzellente Übereinstimmung mit den gemessenen (Abb. 3.12b, rote Balken).

Insgesamt konnte somit die in dem vorangegangenen Unterkapitel vorausgesagte konstante Spindelverschiebung in den Keimbahnzellen experimentell bestätigt werden. Abweichungen zwischen dem vorhergesagten und dem experimentell beobachteten Δx können dabei auf die relativ lange Zeitspanne zwischen zwei Bildaufnahmen von 30 s zurückgeführt werden. Durch eine Extrapolation der Spindelposition, die sich während dieser unbeobachteten Zeitspanne weiterbewegt, können die Werte gut zur Deckung gebracht werden. Eine gute Übereinstimmung liefert dabei eine Extrapolation mit einer (konstanten) Geschwindigkeit von 30 nm/s .

Die Spindelverschiebung in P_0 erfolgt mit konstanter Geschwindigkeit und endet nicht in einer Gleichgewichtsposition

Da P_0 eine andere biochemische Zusammensetzung als spätere Keimbahnzellen aufweist, wurde diese Zelle bisher von der Auswertung explizit ausgeschlossen. Die Verschiebung der Spindel in P_0 , die bereits als Grund für die asymmetrische Teilung der Zygote identifiziert wurde [143, 146], soll nun an dieser Stelle untersucht werden.

Zuerst wird die zur quantitativen Erklärung des beobachteten Teilungsverhältnisses TV benötigte Spindelverschiebung abgeschätzt. Dies geschieht durch ein Vorgehen, wie es im vorangegangenen Unterkapitel beschrieben wurde (Aufteilung der Voxel in Gruppen), allerdings anhand eines künstlich erzeugten Bildes. Die Zygote hat ungefähr eine ellipsoide Form ($50 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$, [1]). Daher wird ein dreidimensionaler Bildstapel isotroper Auflösung erzeugt, der eine Region der genannten Abmessungen enthält. Auf diesen kann nun das oben diskutierte Schema angewendet werden: Anhand einer gegebenen Spindelposition und -orientierung können alle Voxel den zukünftigen Tochterzellen zugeordnet werden. Als Spindelachse fungiert hier die AP-Achse, die in dem künstlichen Bild mit der x -Achse des Koordinatensystems übereinstimmt. Die Position der Spindel wird auf dieser x -Achse iterativ verschoben, das aus der jeweiligen Position folgende Teilungsverhältnis bestimmt (siehe oben) und mit dem experimentell beobachteten verglichen. Dabei ergibt sich die beste Übereinstimmung bei einer exzentrischen Verschiebung von $3,05 \mu\text{m}$. Die

nötige Verschiebung ist damit etwa 1,7 mal so groß wie in den späteren Keimbahnzellen (eine Begründung für diese Diskrepanz wird im nachfolgenden Unterkapitel gegeben).

In der Einleitung dieses Kapitels wurde bereits darauf hingewiesen, dass nicht bekannt ist, ob die Verschiebung der mitotischen Spindel in der Zygote P_0 vor Eintritt in die Anaphase in einer Gleichgewichtsposition endet, oder ob die Verschiebung beim Eintritt in die Anaphase noch andauert. In den vorangegangenen Unterkapiteln konnte gezeigt werden, dass eine solche Spindelverschiebung auch in den späteren P -Zellen Ursache der Asymmetrie ist. Dieselbe Frage stellt sich somit auch für diese Zellteilungen. Dort wurde eine konstante Geschwindigkeit der Verschiebung der Spindel angenommen, eine Rechtfertigung soll daher hier nachgereicht werden.

Die Beantwortung dieser Fragestellung ist aus messtechnischen Gründen am einfachsten in der Zygote P_0 möglich. Aufgrund der Tatsache, dass die Teilungsachse hier mit der AP-Achse identisch ist, liegt die Teilungsachse bedingt durch die Probenpräparation immer ungefähr in einer einzelnen, zweidimensionalen Bildebene des SPIM. Somit muss, im Gegensatz zu späteren P -Zellen, nicht immer ein vollständiger dreidimensionaler Bildstapel des gesamten Embryos aufgenommen werden. Es reicht hier, einige wenige Ebenen im zentralen Bereich nahe der Spindel aufzunehmen. Hierdurch kann die erreichbare Zeitauflösung signifikant erhöht werden.

Konkret wurde bei $n = 8$ Embryonen der Linie OD95 die Mitose der Zygote mit einer Zeitauflösung von $\Delta T = 2\text{ s}$ aufgenommen. Die Anzahl der Ebenen pro Kanal wurde hierfür auf vier reduziert, wobei der Abstand der Ebenen voneinander unverändert blieb. Bei den Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass die Spindel von P_0 möglichst vollständig im aufgenommenen Bereich enthalten ist. Alle Aufnahmen begannen vor oder während der Prophase, während der die Spindel noch eine zentrale Position im Embryo einnimmt [159]. Nach dem Eintritt in die Anaphase, sobald sich also die Tochterchromatid-Ansammlungen voneinander trennen, wurden die Aufnahmen abgebrochen. Die Erstauswertung, d.h. die Bearbeitung der Rohdaten und das Tracking der Spindel, erfolgt auf dieselbe Art und Weise wie dies in Kap. 2.2 beschrieben ist.

Die Auswertung ist im Wesentlichen identisch mit der bereits beschriebenen Bestimmung der Spindelverschiebung Δx in somatischen oder späteren Keimbahnzellen, erfolgt hier aber zeitabhängig. Ausgelesen wird folglich die Größe $\Delta x(t) = \mathbf{d} \cdot (\mathbf{C} - \mathbf{r}_0(t))$ mit der Teilungsachse \mathbf{d} , dem Zellzentrum \mathbf{C} und der nun zeitabhängigen Spindelposition $\mathbf{r}_0(t)$.

Der Spindelort $\mathbf{r}_0(t)$ ist aus dem Tracking bekannt. Getrackte Koordinaten, also auch $\mathbf{r}_0(t)$, sind immer auf den Schwerpunkt des Embryos bezogen. In den vorangegangenen Unterkapiteln wurde der Referenzpunkt, also das Zellzentrum \mathbf{C} , mittels eines Zentrierungsmechanismus bestimmt. Da hier nur ein Teil der Zelle aufgenommen wurde, ist dies an dieser Stelle nicht möglich. Aus diesem Grund wird hier vorerst $\mathbf{C} \equiv 0$ gesetzt und die damit berechneten Absolutwerte von Δx später korrigiert.

Die Teilungsachse \mathbf{d} ist bei P_0 gleich der AP-Achse, d.h. der langen Achse des Embryos, welche anhand des Membrankanals ausgelesen werden kann. Hierzu wird von den vier Ebenen eine Maximumintensitätsprojektion gebildet. Eine Binarisierung mittels eines Schwellwertes und anschließende Öffnung des Bildes stellt den Embryo effektiv frei. Mit der *Matlab*-Funktion *regionprops* (Feld *orientation*) wird der Winkel α zwischen der x -Achse des Koordinatensystems und der langen Achse des Embryos bestimmt. Die lange Achse (AP-Achse) ist damit $\mathbf{d} = (\cos \alpha, \sin \alpha, 0)$. Eine Bestimmung der Teilungsachse mittels der Tochterchromatid-Ansammlungen, wie dies bei späteren Zellen geschehen ist, ist bei P_0 aufgrund der mitotischen Spindeloszillationen nicht stabil. Hierbei oszilliert vor allem der posteriore Pol der Spindel senkrecht zur Teilungsachse. Die Amplituden sind dabei während der Anaphase am größten [158, 160].

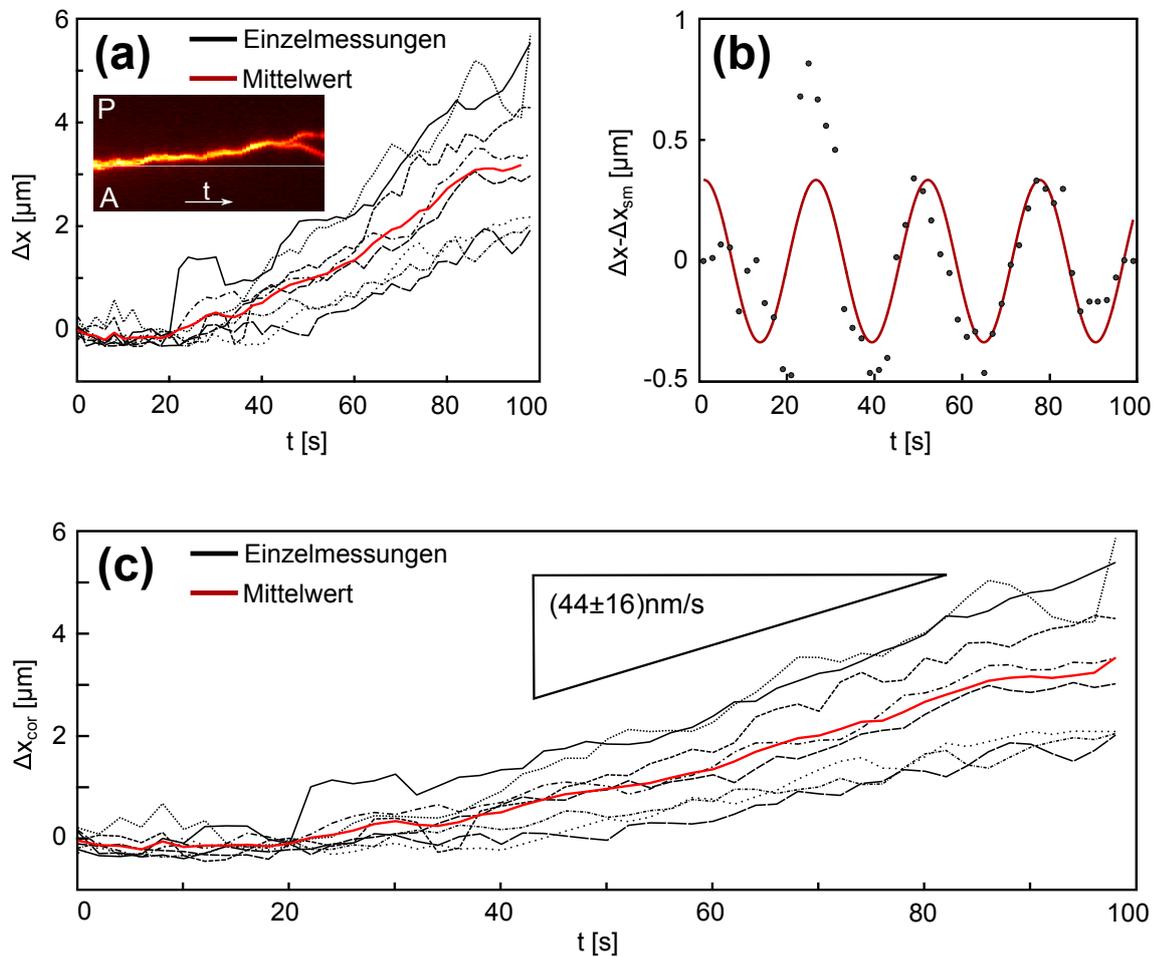


Abbildung 3.13.: Zeitabhängige Messung der Spindelverschiebung in der Zygote. (a) Der Abstand Δx der Metaphasen-Platte in der Zygote P_0 vom Zellzentrum entlang der AP-Achse wächst als Funktion der Zeit in allen $n = 8$ untersuchten Embryonen (schwarze Linien). Die Verschiebung findet in Richtung des posterioren Pols statt. Per Definition entspricht $t = 100\text{s}$ dem Eintritt in die Anaphase und $\Delta x = 0$ dem zeitlichen Mittel der ersten 20s. Im Mittel wird eine maximale Verschiebung von etwa $3\mu\text{m}$ erreicht (rote Linie). Da die Messungen von Oszillation überlagert zu sein scheinen, ist eine definitive Aussage darüber, ob die Verschiebung in einer Gleichgewichtsposition endet oder nicht, nicht möglich. **Einfügung:** Kymograph einer Spindelverschiebung. Rechts ist der Eintritt der Zelle in die Anaphase als Aufspaltung des Signals erkennbar. (b) Von den in (a) dargestellten Kurven $\Delta x(t)$ wurde eine geglättete Version $\Delta x_{sm}(t)$ abgezogen, um den oszillatorischen Anteil der Bewegung herauszufiltern (schwarze Punkte). Die Glättung fand dabei über ein Intervall von $\pm 30\text{s}$ statt. Dargestellt ist dies für einen Embryo. Die Oszillationen können mit Sinuskurven $f(t)$ gefittet werden (rote Linie, siehe Text). Im Mittel ergeben sich dabei Periodendauern von $(27 \pm 4)\text{s}$. (c) Dargestellt sind die um die Oszillationen bereinigten Kurven $\Delta x_{cor}(t) = \Delta x(t) - f(t)$. Man erkennt nun, dass neben dem oszillatorischen Anteil eine Verschiebung mit nahezu konstanter Geschwindigkeit vorliegt. Die Geschwindigkeit ist im Mittel $(44 \pm 16)\text{nm/s}$ und auch am Ende der Metaphase nahezu unverändert. Die Spindel relaxiert folglich nicht in eine Gleichgewichtsposition.

Die Werte für Δx wurden in jedem Embryo für insgesamt 100 s berechnet, wobei der letzte ausgewertete Zeitpunkt der letzten Aufnahme entspricht, die die Zygote eindeutig in der Metaphase zeigt. Die mit dem beschriebenen Vorgehen erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3.13a dargestellt. Aufgrund der oben angesprochenen Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Zellzentrums C werden hierbei die Verschiebungen Δx renormiert. Während der ersten 20 s kann keine konsistente Spindelbewegung festgestellt werden. Als Nullpunkt ($\Delta x = 0$) wird daher die mittlere Position während dieser Zeit verwendet. Gerechtfertigt ist dies durch die hohe Positionsgenauigkeit der Zentrierung in P_0 [159]. Man erkennt, dass sich die Spindel in allen 8 untersuchten Embryonen für etwa 80 s bewegt (vgl. Abb. 3.13a). Die am Ende dieser Zeit erreichte Verschiebung beträgt $(3,2 \pm 1,3) \mu\text{m}$. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den oben vorhergesagten $3,05 \mu\text{m}$.

Die einzelnen Kurven scheinen jedoch von einer Oszillation überlagert zu sein. Daher ist eine fundierte Aussage darüber, ob die Verschiebung in einem Gleichgewicht endet oder nicht, nur schwer möglich. Um diese Oszillationen näher zu untersuchen, werden die Kurven mit einem gleitenden Mittelwertfilter geglättet und von den Originalkurven subtrahiert. Für den gleitenden Mittelwert wurden Daten im Intervall ± 30 s verwendet. Effektiv entspricht dieses Vorgehen einer Tiefpassfilterung. Die so gewonnenen Daten zeigen in der Tat oszillatorisches Verhalten. In Abb. 3.13b ist dieses beispielhaft für einen Embryo gezeigt. An diese Daten werden Sinuskurven der Art $f(t) = a \sin(2\pi t/T + \varphi)$ mit den freien Parametern a, T, φ gefittet (rote Kurve in Abb. 3.13b). Die mittleren Periodendauern T der Oszillationen sind (27 ± 4) s. Dies ist in bemerkenswert guter Übereinstimmung mit der Periodendauer der (hauptsächlich senkrecht zur AP-Achse stattfindenden) Spindeloszillationen von etwa 25 s [158, 160]. Diese können somit bereits während der Metaphase als Longitudinalschwingungen entlang der AP-Achse detektiert werden.

Um die Nettobewegung der Spindel besser beurteilen zu können, werden die Oszillationen aus den Rohdaten herausgerechnet. Hierzu werden von den in Abb. 3.13a gezeigten Kurven die Fits aus Abb. 3.13b subtrahiert, $\Delta x_{cor}(t) = \Delta x(t) - f(t)$. Die Ergebnisse Δx_{cor} sind in Abb. 3.13c dargestellt. Nun wird deutlich, dass sich die Spindel nicht in ein Gleichgewicht bewegt, sondern ihre Verschiebung bis zum Eintritt in die Anaphase andauert. Die Verschiebung geschieht zudem mit annähernd konstanter Geschwindigkeit. Lineare Fits an die Verschiebungen der letzten 80 s ergeben eine mittlere Geschwindigkeit von $(44 \pm 16) \text{ nm/s}$ (Fits an einzelne Kurven, mittlere Steigung + Standardabweichung).

Modell zur Erklärung konstanter Spindelverschiebung

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Spindelverschiebung in Keimbahnzellen sollen nun durch ein Modell rationalisiert werden. Hierfür wird angenommen, dass der Mechanismus, der zur Verschiebung der Spindel führt, in allen P -Zellen grundsätzlich der gleiche ist. Da die Zellpolarisierung in allen Fällen auf dem PAR-System aufbaut und alle P -Zellen die qualitativ gleiche Zusammensetzung haben [20], ist diese Annahme gerechtfertigt.

Ein Modell muss folgende Erkenntnisse berücksichtigen: die Verschiebung der Spindel erfolgt mit einer konstanten Geschwindigkeit und endet nicht in einer Gleichgewichtslage, bevor die Zelle in die Anaphase eintritt. In postzygotischen Keimbahnzellen ist die final erreichte Verschiebung zudem konstant und unabhängig von der Zellgröße, lediglich die Zygote P_0 weist eine demgegenüber größere Verschiebung auf. Relevante experimentelle Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wurden bereits in der Einleitung dieses Kapitels (Kap. 3.3.1) behandelt und werden hier nur knapp wiederholt. Der anteriore Spindelpol bleibt so lange räumlich fixiert, bis die Spindel vollständig assembliert ist [155]. Während der Spindelverschiebung bleibt der anteriore Pol nahezu ortsfest und erfährt nur einen leichten posterioren Versatz. Der posteriore Spindelpol hingegen wird deutlich in pos-

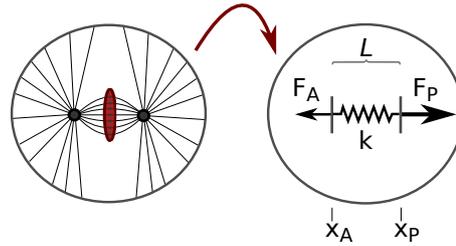


Abbildung 3.14.: Modell zur Erklärung der konstanten Spindelverschiebung. Die Entkopplung der Spindelverschiebung Δx von der Zellgröße kann mit einem einfachen Modell rationalisiert werden. Hierin wird die Spindel als passive Hooke'sche Feder mit Gleichgewichtslänge L und Federkonstanten k modelliert. Auf diese Feder wirken die eindimensionalen, konstanten Kräfte $F_{A/P}$ ($F_A < F_P$). Die Spindel wird infolge gedehnt und reißt bei einer Streckung um s_{max} , was den Eintritt in die Anaphase auslöst. Abbildung übernommen aus [124].

teriore Richtung verschoben [146, 155]. Insgesamt ist der Verschiebung daher auch eine Dehnung der Spindel überlagert. Die wirkenden Zugkräfte werden im Aktomyosinkortex generiert und über astrale Mikrotubuli auf die Spindel übertragen [143, 144, 146, 155]. Das Verhältnis von posterior und anterior wirkenden Kräften in der Zygote beträgt etwa 1,5 [144]. In P_0 werden die Kräfte sowohl auf posteriorer Seite positiv beeinflusst, d.h. verstärkt [143, 144, 146], als auch von anteriorer Seite aus erniedrigt [153, 154]. Wird die Polarisierung der Zygote unterbunden, so dass beide Pole der Zygote entweder den anterioren oder den posterioren Phänotyp annehmen, unterbleibt eine Spindelverschiebung und die Zelle teilt sich symmetrisch. Im Falle eines auf beiden Seiten anterioren Phänotyps reichen die herrschenden Zugkräfte zudem offenbar nicht aus, um einen Eintritt in die Anaphase, d.h. ein Aufreißen der Metaphasen-Platte, hervorzurufen [143].

Werden all diese Ergebnisse kombiniert, lässt sich ein einfaches Modell formulieren, mit dem eine zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung rationalisiert werden kann. Die im Modell enthaltenen Komponenten sind in Abb. 3.14 schematisch dargestellt. Das hier entwickelte Modell ist eindimensional. Alle wirkenden Kräfte sowie die daraus resultierende Spindelverschiebung werden als auf der AP-Achse liegend angenommen. Zur Begründung wird angeführt, dass erstens die Zugkräfte abseits der Pole zum Teil abgeschwächt sind [150, 151] und zweitens sich alle Kraftkomponenten, die senkrecht zur AP-Achse stehen, aufgrund der Symmetrie des Systems im zeitlichen Mittel effektiv aufheben. Auf Zeitskalen, die kürzer als die der Spindelverschiebung sind, treten zwar Spindeloszillationen senkrecht zur AP-Achse auf [158, 160]. Diese finden allerdings hauptsächlich während der Anaphase statt, also nach der Spindelverschiebung. Spindeloszillationen während der Metaphase entlang der AP-Achse, wie sie in diesem Kapitel beschrieben wurden, werden vernachlässigt.

Die auf den anterioren und posterioren Spindelpol wirkenden Kräfte seien F_A und F_P . Sie werden im Kortex generiert und von astralen Mikrotubuli auf den Spindelpol übertragen. Daher sind sie nicht abstandsabhängig. Ferner unterscheiden sie sich auch für die unterschiedlichen Keimbahnzellen nur gering. In [103] wird die Geschwindigkeit der Spindelelongation während der Anaphase in Abhängigkeit vom Zelldurchmesser d gemessen. Die Daten lassen sich durch einen nur leicht mit d ansteigenden affin-linearen Fit beschreiben. Da die wirkenden Kräfte (insbesondere während der Anaphase, in der die Spindel bereits geteilt ist, s.u.) proportional zu der erreichten Geschwindigkeit sind, hängen auch die Kräfte nur gering von der Zellgröße ab. Die Änderung der Kräfte zwischen P_1 und P_3 kann gemäß [103] auf etwa 20% abgeschätzt werden. Dies wird hier vorerst

vernachlässigt (siehe unten für eine Diskussion). Insgesamt werden die Kräfte $\mathbf{F}_{A/P}$ somit als konstant modelliert.

Rücktreibende Kräfte können vollständig vernachlässigt werden. Zwar erfolgt die Zentrierung der Spindel in P_0 hauptsächlich mittels Schubkräften (vom Kortex wegweisend), die ihre Ursache in der Polymerisation von Mikrotubuli haben [161]. Jedoch sind diese Kräfte nachgiebig genug, um eine Spindelverschiebung von wenigen μm nicht zu stören [161]. Die Verweildauer einzelner Mikrotubuli am Kortex ist zudem mit etwa (1-2)s gering [158]. Somit kann auch ein "Formgedächtnis" der Zelle (z.B. infolge der Biegung der Mikrotubuli) vernachlässigt werden.

Die Spindel selbst trägt nicht aktiv zu ihrer Verschiebung bei. Vielmehr setzt sie der auf die Spindelpole ausgeübten Spannung $\mathbf{F}_A + \mathbf{F}_P$ einen Widerstand entgegen, u.a. aufgrund der Quervernetzung polarer Mikrotubuli in der Spindel [162]. Dieses Widerstreben gegen eine Dehnung wird durch eine Hooke'sche Feder mit der Federkonstanten k und der Gleichgewichtslänge L approximiert. L hängt, ebenso wie die Kräfte, nur schwach von der Zellgröße ab. Gemäß [103] ändert sich diese Länge nur um etwa 15% zwischen P_1 und P_3 (das Volumen unterscheidet sich bei diesen beiden Zellen um nahezu eine Größenordnung, Kap. 3.2.1). Es wird angenommen, dass die Spindel reißt, wenn die Feder um eine Länge s_{max} gedehnt wird. Dies wird von der Beobachtung gestützt, dass ein Übergang zur Anaphase unterbleibt, wenn die wirkenden Kräfte zu klein sind [143]. s_{max} wird ferner als konstant angenommen. Eine Kopplung von s_{max} an L wird somit vorerst vernachlässigt (siehe unten).

Bewegungen in Zellen spielen sich generell bei kleinen Reynolds-Zahlen ab [163], so dass die Spindelverschiebung im überdämpften Limes beschrieben werden kann. Folglich werden alle Trägheitsterme in den Bewegungsgleichungen vernachlässigt. Als Koordinaten der Bewegungsgleichungen, $\mathbf{x}_{A/P}$, werden die Abstände der Spindelpole von ihren Ruhepositionen vor Beginn der Spindelverschiebung verwendet. Zu Beginn, während die Spindel noch räumlich fixiert ist (siehe oben, [155]), haben beide Spindelpole voneinander den Gleichgewichtsabstand L und es ist $\mathbf{x}_A(t=0) = \mathbf{x}_P(t=0) = 0$. Bei $t=0$ wird die räumliche Fixierung gelöst und es wirken die beiden konstanten Kräfte \mathbf{F}_A und \mathbf{F}_P auf den anterioren bzw. posterioren Spindelpol ($\mathbf{F}_A < \mathbf{F}_P$). Hierdurch wird die Spindel um einen Betrag $s = \mathbf{x}_P - \mathbf{x}_A$ gestreckt. Neben den beiden Kräften $\mathbf{F}_{A/P}$ wirkt daher zusätzlich noch eine Federkraft der Spindel sowie Reibung (Dämpfung γ). Die Bewegungsgleichungen für $t > 0$ sind folglich

$$\begin{aligned} -\gamma \frac{d}{dt} \mathbf{x}_A + k(\mathbf{x}_P - \mathbf{x}_A) - \mathbf{F}_A &= 0 \\ -\gamma \frac{d}{dt} \mathbf{x}_P - k(\mathbf{x}_P - \mathbf{x}_A) + \mathbf{F}_P &= 0 \end{aligned} \quad (3.11)$$

Die Lösung der beiden gekoppelten Differentialgleichungen mit den Anfangsbedingungen $\mathbf{x}_A(t=0) = \mathbf{x}_P(t=0) = 0$ ist

$$\begin{aligned} \mathbf{x}_A(t) &= \frac{\mathbf{F}_P - \mathbf{F}_A}{2\gamma} \cdot t - \frac{\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_A}{2k} \left(1 - e^{-\frac{2kt}{\gamma}}\right) \\ \mathbf{x}_P(t) &= \frac{\mathbf{F}_P - \mathbf{F}_A}{2\gamma} \cdot t + \frac{\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_A}{2k} \left(1 - e^{-\frac{2kt}{\gamma}}\right) \end{aligned} \quad (3.12)$$

Der Ort der Metaphasen-Platte \mathbf{x}_{MP} entspricht dem Schwerpunkt der Spindel und ist gleich

$$\mathbf{x}_{MP}(t) = \frac{1}{2} (\mathbf{x}_P + \mathbf{x}_A) = \frac{\mathbf{F}_P - \mathbf{F}_A}{2\gamma} \cdot t. \quad (3.13)$$

Die Spindel wird hier also als symmetrisch modelliert. In Einklang mit den Beobachtungen in der Zygote P_0 liefert dieses Modell somit für $\mathbf{F}_{A/P} = \text{const}$ eine mit der Zeit linear anwachsende Verschiebung der Spindel aus dem Zellzentrum heraus. Die Dehnung s der Spindel hingegen folgt gemäß

$$s(t) = \mathbf{x}_P - \mathbf{x}_A = \frac{\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_A}{k} \left(1 - e^{-\frac{2kt}{\gamma}}\right) \quad (3.14)$$

aus Gl. 3.12. Nach der Annahme tritt die Zelle in die Anaphase ein, sobald $s(t) = s_{max}$. Dies ist zur Zeit t_{max} der Fall. Aus Gl. 3.14 folgt

$$t_{max} = -\frac{\gamma}{2k} \ln \left(1 - \frac{ks_{max}}{\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_A}\right). \quad (3.15)$$

Aus t_{max} und Gl. 3.13 kann wiederum die Spindelverschiebung Δx am Ende der Metaphase abgeleitet werden,

$$\Delta x = \mathbf{x}_{MP}(t_{max}) = -\frac{\mathbf{F}_P - \mathbf{F}_A}{4k} \ln \left(1 - \frac{ks_{max}}{\mathbf{F}_P + \mathbf{F}_A}\right). \quad (3.16)$$

Sowohl die Spindelparameter k und s_{max} als auch die Kräfte $\mathbf{F}_{A/P}$ wurden als unabhängig von der Zellgröße angenommen (siehe oben). Daher wird von dem abgeleiteten Modell mit Gl. 3.16 eine zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung vorausgesagt.

Wie oben bereits dargelegt wurde, hängen im realen Embryo sowohl L als auch $\mathbf{F}_{A/P}$ schwach von der Zellgröße ab. Es ist anzunehmen, dass mit L auch die maximale Dehnung s_{max} der Spindel von der Zellgröße abhängt. Werden in Gl. 3.16 alle genannten Größen in erster Näherung gemäß $X \rightarrow X + vR_{zelle}$ ($X = \{s_{max}, \mathbf{F}_A, \mathbf{F}_P\}$) mit der Kopplungsstärke v ersetzt, so heben sich die Korrekturterme auf. Es ergibt sich folglich erneut eine zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung.

Die Spindelverschiebung Δx hängt gemäß Gl. 3.16 explizit vom Verhältnis der Kräfte $\mathbf{F}_A/\mathbf{F}_P$ ab. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass in der Zygote P_0 \mathbf{F}_A negativ reguliert wird [153, 154]. Dies geschieht mittels Proteinen, die im anterioren Teil des Kortex lokalisiert sind (die Lokalisierung wird vom PAR-System gesteuert). Falls der cytoplasmische Anteil dieser Proteine im Vergleich zu dem im anterioren Kortex gebundenen Anteil klein ist, wird die Mehrzahl dieser Proteine bei der Cytokinese von P_0 in die anteriore Tochterzelle AB segregiert. Somit wären diese Proteine und damit auch ihr Einfluss in der postzygotischen Keimbahn nicht mehr vorhanden. Da Transkription und in Folge die Produktion neuer Proteine in der Keimbahn deaktiviert ist [55, 56], wird dort keine mit P_0 vergleichbare Konzentration jener Faktoren mehr erreicht. Folglich kann die anteriore Zugkraft \mathbf{F}_A in P_1 bis P_3 nicht so stark reduziert werden wie in der Zygote, d.h. $|\mathbf{F}_A/\mathbf{F}_P|_{P_1-P_3} > |\mathbf{F}_A/\mathbf{F}_P|_{P_0}$. Gemäß Gl. 3.13 führt dies zu einer langsamer ablaufenden Spindelverschiebung. Nach Gl. 3.14 wird die Spindel jedoch gleichzeitig schneller gedehnt, so dass der Übergang in die Anaphase früher stattfindet. Insgesamt ist somit die erreichte Spindelverschiebung in P_1 bis P_3 kleiner als in der Zygote P_0 . Diese Vorhersage des Modells, die sich für den Fall einer hinreichend starken kortikalen Lokalisierung der regulierenden Proteine ergibt, stimmt mit den experimentellen Beobachtungen überein.

3.3.3. Diskussion

Zuerst werden die wichtigsten Ergebnisse dieses Kapitels stichpunktartig zusammengefasst:

- Etwa 40 % aller Zellen bis zur Gastrulation zeigen signifikante geometrische Asymmetrien bei ihrer Zellteilung. Dies schließt alle Keimbahnzellen, aber auch einige somatische Zellen ein.
- Die Asymmetrien der meisten somatischen Zellen gehen zurück, wenn mechanischer Druck durch Entfernung der Chitinhülle vermindert wird. Ebenso kann bei somatischen Zellen keine konsistente Verschiebung der mitotischen Spindel festgestellt werden. Die Asymmetrien sind daher wahrscheinlich eine Folge sterischer Effekte.
- Theoretische Überlegungen und Messungen zeigen, dass in den postzygotischen Keimbahnzellen während der Metaphase eine zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung auftritt. Die beobachteten Asymmetrien lassen sich mit diesen Spindelverschiebungen erklären.
- In der Zygote ist die auftretende Spindelverschiebung größer als in späteren Keimbahnzellen. Sie erfolgt mit konstanter Geschwindigkeit und dauert bis zum Eintritt in die Anaphase an.
- Die Entkopplung der Spindelverschiebung von der Zellgröße kann durch ein einfaches mechanisches Modell rationalisiert werden. Dort wirken konstante Kräfte auf die Spindel ein und bringen sie beim Erreichen einer kritischen Dehnung zum Reißen. Innerhalb des Modells kann der Unterschied zwischen der Zygote und späteren Keimbahnzellen durch eine unterschiedliche biochemische Komposition erklärt werden.

Die geometrischen Asymmetrien früher Zellteilungen konnten in dieser Arbeit erstmals präzise gemessen werden. Grundlegend hierfür war die Bestimmung der Zellvolumina, die mit bis dato unerreichter Genauigkeit möglich war (vgl. Kap. 3.2.1). Zur Klassifikation der Zellteilungen als symmetrisch/asymmetrisch wurde ein Schwellwert für das Teilungsverhältnis definiert. Dessen Definition erfolgte dabei anhand grundsätzlicher Überlegungen zur prinzipiell erreichbaren Messgenauigkeit und nicht anhand auftretender Schwankungen der Messwerte. Wie in Kap. 3.2.1 gezeigt wurde, spielen solche Schwankungen innerhalb der Messungen eines Embryos keine Rolle, da die Zellvolumen während des Zellzyklus hinreichend oft gemessen werden (der Einfluss grober Segmentierungsfehler wird so unterdrückt). Zudem wird eine Zellteilung nur dann als asymmetrisch charakterisiert, wenn sie in der Mehrheit der untersuchten Embryonen konsistent auftritt; dies ist hier durch die Verwendung des Median-Wertes aller einzelnen Teilungsverhältnisse sichergestellt. Im Vergleich zur Verwendung des arithmetischen Mittelwertes wird damit zusätzlich der Einfluss einzelner, sich abnorm verhaltender Embryonen unterdrückt. Insgesamt erlaubt dieses Verfahren eine zweifelsfreie Klassifikation asymmetrischer Zellteilungen unter Inkaufnahme falsch-negativer Einordnungen (fälschliche Klassifikation als symmetrische Teilung).

Innerhalb der Gruppe somatischer Zellen zeigen neben der sich bekanntermaßen asymmetrisch teilenden Zelle *EMS* [20, 31, 132] auch weitere geometrische Asymmetrien. Dieses Verhalten ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden und stellt somit eine neue Erkenntnis dar. Außer für *EMS* sind keine biochemischen Polarisierungen dieser asymmetrisch teilenden Zellen entlang der relevanten Teilungsachsen beschrieben. Darauf aufbauend konnten in dieser Arbeit starke Hinweise darauf gefunden werden, dass die

beobachteten Asymmetrien eine Folge sterischer Wechselwirkungen sind. Diese Hinweise umfassen zum einen die Tatsache, dass die Asymmetrien tendenziell zurückgehen, wenn äußere Zwänge durch die Entfernung der starren Chitinhülle abgemildert werden. Zum anderen konnten keine konsistenten Spindelverschiebungen für die somatischen Zellen detektiert werden. Solche Spindelverschiebungen sind charakteristisch für biochemisch/genetisch vorprogrammierte Asymmetrien (siehe unten) [20].

Die Gesamtheit der Indizien untermauert somit die Hypothese rein sterisch induzierter Asymmetrien, liefert jedoch noch keinen eindeutigen Nachweis. Hierzu müssten mechanische Wechselwirkungen zwischen den Zellen vollständig unterbunden werden und die Asymmetrien in der Folge komplett verschwinden. Dies ist experimentell prinzipiell möglich. Um sterische Zwänge auszuschließen, muss nicht nur die starre Chitinhülle, sondern die Eihülle als ganzes entfernt werden. Optional können einzelne Zellen dann auch noch räumlich getrennt werden. Ein solcher Eingriff wurde zu anderen Zwecken bereits in mehreren Studien erfolgreich durchgeführt [58, 61, 95]. Jedoch ergeben sich dabei neue Probleme, die eine Interpretation der Daten erschweren. Einerseits würden sich die auftretenden Zellkontakte in eihüllenlosen Embryonen stark von solchen in ungestörten Embryonen unterscheiden [58] (im Unterschied zur Mehrheit der Embryonen beim hier gewählten Vorgehen, vgl. Kap. 3.1). Hierdurch könnten eventuell für die Asymmetrien verantwortliche Signaltransduktionen, die z.B. zur Symmetriebrechung benötigt werden, nicht stattfinden. Gingen nun die beobachteten Asymmetrien in diesem Fall vollständig zurück, wäre nicht klar, ob dies aufgrund fehlender Signaltransduktion oder aufgrund fehlender mechanischer Zwänge geschieht. Ein weiteres, experimentelles Hindernis ist, dass die Osmolarität des umgebenden Mediums genau kontrolliert werden müsste, um ein osmotisches Schwellen oder Schrumpfen der Zellen zu verhindern. Bereits kleine zeitliche Schwankungen der Zellvolumina können die Messung der Teilungsverhältnisse (definiert als Quotient) stark verfälschen. In Experimenten mit eihüllenlosen Embryonen anderer Arbeitsgruppen ist eine Volumenbestimmung nicht erfolgt [58, 61, 94–96]. Daher kann hier nicht beantwortet werden, wie stark sich der beschriebene Effekt auf die Messungen auswirken würde.

An dieser Stelle soll noch auf eine mögliche Erklärung für die relativ großen Asymmetrien der Zellen *MSa*, *MSp*, *Ca* und *Cp* eingegangen werden. Wie die Studie von Yamamoto und Kimura zeigt, hat Adhäsion durchaus Einfluss auf Prozesse während der frühen Embryogenese des *C. elegans* [61], auch wenn sie in dieser Arbeit meist vernachlässigt wird. Aufgrund der Abfolge der Zellteilungen haben die oben genannten Zellen zum Zeitpunkt ihrer Teilung ein etwa doppelt so großes Volumen wie alle anderen. Im Gegensatz zu anderen somatischen Zellteilungen, bei welchen die Zellen von etwa gleich großen Nachbarn umgeben sind, sind *MSa*, *MSp*, *Ca* und *Cp* daher von kleineren Nachbarn (vorwiegend der *AB*-Linie) umgeben. Daher steigt die *relative* Dichte adhäsiver Membran in der direkten Umgebung der teilenden Zellen an. Es ist möglich, dass dieser Umstand besonders auf die Teilung der vier genannten Zellen signifikanten mechanischen Einfluss ausübt und so zu den hohen Asymmetrien führt. Ein Test dieser Hypothese wäre z.B. durch ein Ausschalten der Adhäsion möglich [61, 164].

Im Kontext der Arbeit anderer Forschungsgruppen sind die Ergebnisse bezüglich der Keimbahnzellen am relevantesten. Diese gruppieren sich in ein intensiv bearbeitetes Feld ein, nämlich das der biochemisch/genetisch vorprogrammierten asymmetrischen Zellteilungen. Bei Arbeiten an *C. elegans* werden hier typischerweise nur die Vorgänge in der Zygote P_0 untersucht. Diese Arbeit gehört somit zu den ersten, bei welchen der Fokus auch auf spätere Keimbahnzellen gelegt wird. Des Weiteren ist der Ursprung der wirkenden Kräfte intensiv erforscht, ebenso wie das Zustandekommen des Kräfteungleichgewichts entlang der AP-Achse (siehe Kap. 3.3.1). Die Bewegung der Spindel, die aus den wirkenden Kräf-

ten folgt, wurde jedoch bisher kaum untersucht. Somit ist die vorliegende Arbeit auch eine der ersten, bei welcher die Charakterisierung der resultierenden Spindelverschiebungen im Vordergrund steht.

Durch die Verschiebung des Fokus auf postzygotische Keimbahnzellen konnte der Einfluss der Systemgröße auf die ablaufenden Prozesse untersucht werden. Eine nötige, aber relativ schwache Annahme hierbei ist, dass der Mechanismus der Spindelverschiebung in allen Keimbahnzellen grundsätzlich der gleiche ist (Rechtfertigung siehe Kap. 3.3.2). Konkret wurde hier anhand theoretischer Überlegungen vorhergesagt, dass die für die Asymmetrie der Teilungen verantwortliche Spindelverschiebung unabhängig von der Zellgröße ist. Dies konnte darüber hinaus experimentell bestätigt werden. Die Diskrepanz zwischen der vorhergesagten und gemessenen Spindelverschiebung kann anhand der weiteren Ergebnisse dieses Kapitels befriedigend erklärt werden: da die Spindelverschiebung mit annähernd konstanter Geschwindigkeit erfolgt (gezeigt für P_0), ist die gemessene Verschiebung wegen eines unbeobachteten Zeitraums zu klein.

Die Entkopplung der Spindelverschiebung von der Zellgröße erlaubt eine experimentell überprüfbare Vorhersage: eine Veränderung der Zellgrößen sollte geänderte Teilungsverhältnisse nach sich ziehen. Bei vergrößerten Zellen müsste die Asymmetrie sinken, bei verkleinerten steigen. In Kap. 3.2.2 wurde gezeigt, dass eine solche Veränderung der Systemgröße experimentell mittels RNAi möglich ist. Jedoch ändert sich dort das totale embryonale Volumen lediglich um (15-30)%. Unter der Annahme, dass diese Änderungen näherungsweise auch für die Zellvolumina gelten, können mit Gl. 3.9 und Gl. 3.10 die erwarteten Änderungen der Teilungsverhältnisse abgeschätzt werden. Es zeigt sich, dass diese Änderungen für P_1 bis P_3 nur etwa (5-8)% betragen. Die natürlich auftretenden Schwankungen der Messwerte (siehe Fehlerbalken in Abb. 3.8 oder Abb. 3.9b) sind jedoch zu groß, um solch geringe Änderungen bei den kleinen Anzahlen in dieser Arbeit untersuchter Embryonen signifikant zu detektieren. Ein Vergleich der Daten ungestörter und RNAi-behandelter Embryonen zeigt keinen konsistenten Trend (nicht gezeigt). Hier müssten somit deutlich größere Stichproben verwendet werden.

Ebenso wurde der Einfluss der Temperatur auf die Asymmetrien, insbesondere in der Keimbahn, nicht untersucht. Dies war nicht möglich, da für die temperaturabhängigen Aufnahmen Embryonen der Linie XA3501 verwendet wurden, bei welchen eine Markierung der Plasmamembran fehlt. Keine der in diesem Kapitel beschriebenen Analysen kann somit an diesen Embryonen durchgeführt werden. Die Ergebnisse aus Kap. 3.1.1 legen jedoch den Schluss nahe, dass die absoluten Spindelverschiebungen kaum von der Temperatur abhängen: die Bewegung der Zellkerne findet bei höheren Temperaturen im gleichen Maße schneller statt, wie sich die Zellzyklen verkürzen. Diese Beobachtung gilt während des gesamten Zellzyklus. Somit ist es wahrscheinlich, dass die finale Spindelverschiebung bei höheren Temperaturen zwar schneller erreicht wird, sich ihr absoluter Wert jedoch nicht ändert. Aufgrund dieser Überlegungen wurde auf eine zeitaufwändige Wiederholung der temperaturabhängigen Messreihe mit Embryonen der Linie OD95 verzichtet.

Insgesamt stellen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich Keimbahnzellen einen wichtigen Baustein dar, um ein umfassendes Gesamtbild der Vorgänge bei asymmetrischen Zellteilungen zu erstellen: Nach einer initialen Symmetriebrechung erfolgt eine Polarisierung der Zelle mittels eines Turing-ähnlichen Advektions-Reaktions-Diffusions-Systems [20, 45]. Diese Polarisierung führt zu einem Ungleichgewicht der auf die Spindel wirkenden Kräfte [20, 143, 144, 146]. Aus diesem Kräfteungleichgewicht folgt schließlich eine Verschiebung der Spindel mit konstanter Geschwindigkeit bis zum Einsetzen der Anaphase, wobei die erreichte Verschiebung von der Zellgröße unabhängig ist, jedoch von der biochemischen Zusammensetzung der Zelle beeinflusst wird (Interpretation der Ergebnisse dieser

Arbeit). Die finale Position der Metaphasen-Platte definiert schlussendlich die Ebene der Cytokinese [18, 19] und führt somit zu Tochterzellen unterschiedlicher Größe.

Eine erste formalisierte Version dieses Gesamtbildes stellt das in dieser Arbeit entwickelte Modell zur Beschreibung der Spindelverschiebung dar. Es beschreibt mögliche Prozesse in stark vereinfachter Form und baut auf einigen Annahmen auf. So ist die Reduktion auf eine Raumdimension für den Anfang sicherlich gerechtfertigt, da auch die Bewegung im Wesentlichen nur entlang einer Raumdimension stattfindet. Die überlagerten und später deutlich zutage tretenden Spindeloszillationen in der Zygote können im Modell allerdings nicht mit beschrieben werden. Ebenso ist die Annahme längenunabhängiger und zeitlich konstanter Kräfte $F_{A/P}$ eine Vereinfachung der tatsächlichen Gegebenheiten [158]. Weiterhin legen Messungen zwar nahe, dass $F_{A/P}$ nur schwach von der Zellgröße abhängen [103], jedoch ist dies bisher nicht befriedigend erklärbar. So sollte z.B. P_2 (als Tochterzelle von P_1) in erster Näherung nur über etwa halb so viele Kraftgeneratoren verfügen wie P_1 , was die absolut wirkenden Kräfte beeinflussen sollte. An dieser Stelle sind daher weitere Experimente erforderlich, um die Abhängigkeiten aufzuklären. Das hier entwickelte Modell ist daher insgesamt als qualitative Rationalisierung der zellgrößenunabhängigen Spindelverschiebung anzusehen, bei welchem Erkenntnisse zur Polarisierung und Kraftgeneration (siehe oben) in $F_{A/P}$ kodiert enthalten sind. Auf molekularer Ebene bleiben jedoch viele Prozesse weiterhin unverstanden. Werden auf diesem Gebiet zukünftig Fortschritte erzielt, so kann das Modell als Basis für eine verfeinerte Beschreibung der ablaufenden Vorgänge verwendet werden.

Schließlich bleibt noch anzumerken, dass bisher nicht klar ist, warum geometrisch asymmetrische Zellteilungen überhaupt auftreten. Biochemische Asymmetrien werden benötigt, um Tochterzellen mit unterschiedlichen Entwicklungspotentialen auszustatten. Hierfür ist jedoch eine geometrische Asymmetrie nicht zwingen nötig. Warum also treten sie dennoch auf? Über die Antwort kann hier nur spekuliert werden. Ein möglicher Grund ist, dass die beobachteten Asymmetrien dazu führen, dass alle Zellen am Ende der Embryonalentwicklung ähnliche Volumina haben. Nach der Teilung von P_4 in Z_1 und Z_2 finden keine weiteren Zellteilungen in der Keimbahn statt [31]. In ungestörten Embryonen gilt $V_{Z_{1/2}} \approx V_{P_4}/2 \approx 200 \mu\text{m}^3$. In der AB -Linie treten hingegen insgesamt 9 Zellteilerunden auf [31], so dass näherungsweise $V_{AB_{(9)}} \approx V_{AB}/2^9 \approx 30 \mu\text{m}^3$ gilt. Die Volumina unterscheiden sich zwar stark, liegen aber noch innerhalb einer Größenordnung. Bei Abwesenheit aller geometrischen Asymmetrien hingegen würde ungefähr gelten: $V_{Z_{1/2}} \approx V_{P_0}/2^5 \approx 800 \mu\text{m}^3$ und $V_{AB_{(9)}} \approx V_{P_0}/2^{10} \approx 25 \mu\text{m}^3$. Der Unterschied würde somit einen Faktor 32 betragen. Bei festem Abstammungsbaum aller Zellen, aber fehlender Asymmetrie, würden folglich am Ende der Embryogenese Zellen mit deutlich unterschiedlichen Größen vorliegen. Dies hat u.A. Einfluss auf die Oberfläche der Zellen ($A \propto V^{2/3}$), die wiederum die Anzahl der Zellnachbarschaften und damit der möglichen Signaltransduktionen beeinflusst.

Der Einfluss der Asymmetrien auf die Zellanordnung während der frühen Embryogenese wird in Kap. 3.6 untersucht.

3.4. Nukleusgrößen während der frühen Entwicklung

Thema dieses Kapitels ist die Regulierung der Zellkerngröße in *C. elegans*. Zuerst soll in einer kurzen Einleitung zum Thema hingeleitet werden. Daraufhin werden der Stand der Forschung an *C. elegans* und anderen Modellsystemen bzgl. der Größenskalierung von Zellorganellen allgemein und dem Zellkern im Besonderen umrissen und offene Fragen aufgezeigt. Im Anschluss daran werden die bisherigen Ergebnisse präsentiert. Zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Arbeit sind die Arbeiten an dieser Thematik noch nicht

abgeschlossen, so dass die hier gezeigten Ergebnisse nur einen Zwischenstand darstellen können. Mögliche Erklärungs- bzw. Modellierungsansätze werden gegeben. Abschließend folgt eine Diskussion der bisherigen Ergebnisse.

Die Arbeit an dieser Thematik erfolgt in Kollaboration mit T. Ozawa und A. Kimura (National Institute of Genetics, Mishima, Japan). Eine Veröffentlichung der Ergebnisse in einem Fachjournal ist in Vorbereitung.

3.4.1. Einleitung

Wichtige Eigenschaften des Zellkerns sind seine Größe und seine Morphologie. Innerhalb einer Zellart ist die Größe eines Zellkerns typischerweise auf ein gewisses Intervall beschränkt [10]. Änderungen der typischen Morphologie oder Größe eines Zellkerns werden mit einer Vielzahl an Erkrankungen in Verbindung gebracht. Für keine davon ist abschließend geklärt, ob die Veränderung der Zellkernmorphologie und -größe zur Pathogenese beiträgt oder nur ein sekundärer Effekt ist [10]. Krebszellen verfügen oft über signifikant vergrößerte Zellkerne [165–167], so dass diese Eigenschaft auch zur Diagnostik herangezogen werden kann.

Die Zellkerngröße kann auch bei der Entwicklung eine Rolle spielen, insbesondere die Kern-Plasma-Relation (*KPR*), also das Verhältnis zwischen Kernvolumen und dem Volumen des Cytoplasmas ($KPR = V_{nuc}/V_{cyto}$). So ist die sog. *mid-blastula transition*, d.h. der Zeitpunkt, an dem zygotische Transkription (die Übersetzung von DNA in RNA zur Proteinsynthese durch den Embryo selbst) aktiviert wird, in Embryonen von *Xenopus laevis* durch einen Schwellwert im *KPR* geregelt [168]. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der effektiven Verdünnung einer (bisher unbekannt) Substanz, die auf eine aufgrund der Zellteilungen exponentiell steigende Menge DNA verteilt werden muss [168]. In Embryonen von *Drosophila melanogaster* hingegen konnte gezeigt werden, dass das *KPR* Einfluss auf die Regulierung der Zellzyklen ausübt: wird das *KPR* artifiziell geändert, so wird eine Zellteilungsrunde entweder übersprungen oder eine weitere eingefügt, um das angepeilte *KPR* wiederherzustellen [169].

Insgesamt zeigt dies, dass die Zellkerngröße einen entscheidenden Einfluss auf Entwicklung und Gesundheit eines Organismus haben kann. Bei *C. elegans* besteht hier ein deutlicher Mangel an Daten und Erkenntnissen, die Zellkerngröße ist *de facto* nicht untersucht. Das Thema soll daher an dieser Stelle eingehend untersucht werden. Gewonnene Erkenntnisse können zudem eventuell auf andere Spezies übertragen werden.

Regulierung der Organell- und Zellkerngröße - Stand des Wissens

Hier wird zuerst allgemein auf Skalierungsverhalten verschiedener Zellorganellen in unterschiedlichen Modellorganismen eingegangen, bevor bisherige Erkenntnisse über die Regulierung der Nukleusgröße zusammengetragen werden.

Skalierung zellulärer Strukturen in *C. elegans* und anderen Organismen. Gesichertes Wissen über die Mechanismen der Regulierung der Organellgröße ist insgesamt relativ spärlich [170]. Einige grundlegende Mechanismen finden sich z.B. in einem aktuellen Review von Reber und Goehring [171]. Ein häufig verwendeter Erklärungsansatz sind limitierende Komponenten (*limiting components*, reviewt z.B. in [171, 172]). Hierbei ist eine bestimmte Proteinfamilie oder ein anderes zum Strukturaufbau benötigtes Molekül nur in einer endlichen Stückzahl vorhanden, wodurch der Organellgröße eine obere Schranke gesetzt wird. Gleichzeitig beeinflusst die Limitierung die Wachstumsdynamik der Organellen:

Zu Beginn, wenn noch viele freie Bausteine vorhanden sind und somit in hoher Konzentration vorliegen, assembliert sich die Organellstruktur mit einer relativ hohen absoluten Wachstumsrate. Je größer sie dabei wird, desto kleiner wird der Pool freier Bausteine und die Wachstumsrate nimmt ab [172]. In *C. elegans* können mit limitierenden Komponenten z.B. die Größen der Zentrosomen [173] oder der Nukleoli (membranlose Organellen im Zellkern) [102] erklärt werden. In *in vitro* aufgebauten mitotischen Spindeln (hergestellt in Extrakten aus Eiern von *Xenopus laevis*) konnte gezeigt werden, dass die Dimensionierung der Spindeln linear mit dem cytoplasmischen Volumen skaliert. Die Erklärung ist auch hier über eine limitierende Komponente möglich [174, 175]. Eine weitere Studie im selben experimentellen System erklärt die Spindelskalierung durch ein Mikrotubulidepolymerisierendes Protein, das bei kleiner werdenden Zellen in immer höherer Konzentration im Cytoplasma vorliegt und so zur Verkleinerung der Spindeln bei kleineren Zellen beiträgt [176].

Andere Skalierungsverhalten werden nicht über limitierende Komponenten, sondern über Kräfte(gleichgewichte) erklärt. In *C. elegans* ist der von den Spindelpolen zurückgelegte Weg während der Anaphase (Spindelelongation) affin-linear vom Zelldurchmesser abhängig, was durch die Kräfte auf astrale Mikrotubuli erklärt werden kann [103]. In der selben Studie wird gezeigt, dass die Länge der Spindel während der Metaphase ebenso affin-linear vom Zelldurchmesser abhängt (siehe auch Kap. 3.3 und [177]). Zudem korreliert die Breite der Spindel mit der Größe der Zelle, allerdings nichtlinear. Es liegt folglich ein allometrischer Zusammenhang vor. Dieser kann über ein Kräftegleichgewicht aus elastisch expandierenden und komprimierenden Kräften erklärt werden [178].

Die Größe der kondensierten mitotischen Chromosomen in *C. elegans* hängt ebenso von der Zellgröße bzw. der Nukleusgröße ab. Während die Breite nahezu unabhängig von der Zellgröße mit etwa 0,6 μm konstant ist, nimmt die Länge von etwa 3 μm in der Zygote auf knapp unter 2 μm im 200-zelligen Stadium ab [104]. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Chromosomengröße von der nuklearen DNA-Dichte maßgeblich beeinflusst wird.

Regulierung der Zellkerngröße und -morphologie in *C. elegans* und anderen Organismen. Trotz der ihr zukommenden Bedeutung (siehe oben) ist die Regulierung der Zellkerngröße während der Interphase nicht gut verstanden. Der aktuelle Stand der Forschung wird z.B. in einem Review von Mukherjee *et al.* zusammengefasst [10].

In der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, dass das *KPR* über einen großen Volumenbereich konstant bei ca. (7-8)% liegt. Dies ist unabhängig vom DNA-Gehalt, gilt also auch für haploide oder polyploide Individuen. Mittels genetischer Methoden wurde das Volumen der Hefezellen um mehr als das 35-fache geändert, ohne dass sich signifikante Abweichungen vom beschriebenen Verhalten zeigten. In Zellen, die über mehrere Nuklei verfügen, hängt das Nukleusvolumen von der Größe der zugehörigen Voronoi-Region ab. Zudem wachsen Nuklei schneller, wenn sie in einen großen cytoplasmischen Pool eingebettet sind, als in einem kleinen [179]. Die geschilderten Ergebnisse sind in ähnlicher Weise auch für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gültig [180]. Ein Grund für die beschriebene Skalierung des Zellkerns mit der Zellgröße kann in keiner der beiden genannten Studien gegeben werden.

Während der frühen Embryogenese des *C. elegans* ist die Situation eine andere, da hier kein Zellwachstum stattfindet und die *G*-Phasen im Zellzyklus übersprungen werden. Aufgrund des fehlenden Zellwachstums muss dieses auch nicht mit einem (hypothetischen) Nukleuswachstum synchronisiert werden. Insgesamt gibt es nur wenige publizierte Daten zur Nukleusgröße in *C. elegans*, die in den zitierten Studien auch nicht das Hauptaugenmerk bildeten. Hara *et al.* zeigen einen ungefähr linearen Zusammenhang zwischen Zell-

und Nukleusdurchmesser am Ende der Interphase, der bei großen Zellen (Durchmesser größer als 20 μm) etwas abflacht [103, 104]. Der funktionale Zusammenhang zwischen Zell- und Nukleusgröße wird nicht weiter untersucht. Eine genetisch verursachte Vergrößerung oder Verkleinerung der Zellen mittels RNAi überträgt sich auf die Zellkerngröße [104]. Die Zellkerne werden ebenfalls signifikant kleiner, wenn das Gen *ran-3*, ein Regulator der Chromosomenkondensation, abgeschaltet wird [104, 181]. Ebenfalls großen Einfluss auf die Kerngröße und -morphologie hat Lamin (siehe Kap. 1.1.1). Bei einer Ausschaltung des einzigen in *C. elegans* vorkommenden Lamins LMN-1 ändert sich das Verhalten des Zellkerns vollständig: die vormals sphärische Form geht verloren, es treten nun große Fluktuationen auf kurzen Zeitskalen (einige Sekunden) auf [182]. LMN-1 ist während der Interphase in der Lamina sowie im Nukleoplasma (d.h. innerhalb der Kernmembran) lokalisiert, wohingegen es während der Mitose in der ganzen Zelle verteilt vorliegt [182, 183].

Die einzige auffindbare Untersuchung des funktionalen Zusammenhangs zwischen Zell- und Kerngröße in *C. elegans* stammt von Arata *et al.* [107]. Hier wurde gezeigt, dass für die Zelllinien *AB*, *MS*, *C* und *P* jeweils am Ende der Interphase eine allometrische Beziehung der Art $V_{nuc} \propto V_{zelle}^{0,63}$ (Zellvolumen V_{zelle} , Nukleusvolumen V_{nuc}) gilt. Die Größe des Zellkerns ändert sich also klar mit kleiner werdenden Zellen. Eine Erklärung konnte in der Studie aber nicht gegeben werden (die Größenskalierung des Zellkerns war nicht Hauptgegenstand der Studie).

Schierenberg *et al.* konnten schließlich zeigen, dass kleinere Nuklei entstehen, wenn einer Zelle etwas Cytoplasma entfernt wird [41]. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Komponenten im Cytoplasma einen Einfluss auf die Zellkerngröße haben.

Für die beiden Frosch-Spezies *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* konnte gezeigt werden, dass dort die embryonalen, ebenfalls blastomerischen Nukleusvolumina während der Interphase gemäß zwei verschiedenen Mechanismen festgelegt werden [184]. Es findet generell ein Wachstum der Kerne statt. Zu Beginn der Embryogenese, während die Zellen noch relativ groß sind, dauert dieses Wachstum während der gesamten Interphase an und wird durch den erneuten Eintritt in Mitose unterbrochen. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird hauptsächlich von der nuklearen Importrate von Lamin B3 durch die Kernporen bestimmt. Bei späteren, deutlich kleineren Zellen erreichen die Zellkerne nach einer Wachstumsphase ein stationäres Volumen, da hier die Anzahl der vorhandenen Lamine limitierend wird [184]. Es gibt Hinweise darauf, dass Lamine auch in menschlichen Zellen eine Rolle spielen [185].

Offene Fragen

In der vorangegangenen Zusammenfassung bisheriger Erkenntnisse wurde bereits darauf hingewiesen, dass bezüglich der Zellkerngrößen während der Embryogenese des *C. elegans* ein Mangel an Daten herrscht. Alle publizierten Daten beziehen sich ausschließlich auf die Kerngröße am Ende der Interphase. Einige Fragen, die daher im Laufe dieses Kapitels beantwortet werden sollen, sind daher:

- Wie kann der allometrische Zusammenhang $V_{nuc} \propto V_{zelle}^{0,63}$ am Ende der Interphase erklärt werden?
- Welcher Gestalt ist der zeitliche Verlauf der Nukleusgröße während der Interphase? Bilden sich die Zellkerne nach erfolgter Mitose in ihrer finalen Größe oder findet während der Interphase ein Wachstum statt?
- Falls ein Wachstum stattfindet, wodurch wird dessen Dynamik bestimmt?

3.4.2. Ergebnisse

Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse über die Regulierung der Zellkerngröße während der frühen Entwicklung präsentiert. Zuerst wird die zeitliche Entwicklung der Zellkernvolumina während der Interphase untersucht. Dabei wird auch die hier verwendete Methode der Zellkernvolumenbestimmung mit einem von T. Ozawa und A. Kimura verwendeten Ansatz verglichen, sowie die in der Literatur dargestellte Skalierung am Ende der Interphase verifiziert. Es kann gezeigt werden, dass Kerne während der Interphase wachsen. Sie streben dabei exponentiell einer finalen Größe entgegen, die jedoch nicht immer erreicht wird, bevor die Zelle wieder in Mitose eintritt. Die Dynamik des Wachstums korreliert des Weiteren mit der Zellgröße und ist temperaturunabhängig. Ferner kann gezeigt werden, dass bei einer hinreichend langen (hypothetischen) Verlängerung der Interphase in Zellen des *C. elegans* eine konstante *KPR* vorläge. Abschließend werden Ansätze zur Modellierung und Erklärung der gewonnenen Einsichten dargelegt und diskutiert.

Zellkerne wachsen während der Interphase

Das zur Bestimmung der Nukleusvolumina anhand von Aufnahmen der Linie OD95 verwendete Vorgehen wurde bereits in Kap. 2.2.3 beschrieben. Zuerst wird in Maximumintensitätsprojektionen des Histonkanals für jeden untersuchten Zellkern in jedem Bildstapel, in dem der Kern vorhanden ist, seine Querschnittfläche bestimmt. Um daraus sein Volumen zu berechnen, werden drei Annahmen gemacht. Erstens wird die segmentierte Querschnittfläche als rund angenommen, so dass aus der Fläche der Radius des Kerns bestimmt werden kann. Zweitens wird der Kern insgesamt als sphärisch angenommen, so dass aus dem Radius sein Volumen berechnet werden kann. Die Rechtfertigung für beide Annahmen ist, dass die Kerne immer als nahezu runde Objekte abgebildet und segmentiert werden, egal von welcher Seite der Embryo betrachtet wird (siehe Kap. 2.2.3). Drittens muss angenommen werden, dass die Histonanordnung den Kern, d.h. das Volumen innerhalb der Kernmembran, vollständig ausfüllt. Dies muss nicht zwingend der Fall sein: Denkbar wäre auch eine Lokalisierung des Chromatins (inkl. der Histone) in nur einem Teilbereich des Zellkerns (zumindest während eines Teils der Interphase). Daher wird diese Annahme im Folgenden experimentell verifiziert.

Mit dem beschriebenen Vorgehen können Embryonen unter vier Konditionen ausgewertet werden. Dies umfasst ungestörte Embryonen ($n = 9$), solche ohne starre Chitinhülle ($n = 9$) sowie genetisch vergrößerte (*C27D9.1* (RNAi), $n = 7$) bzw. verkleinerte Embryonen (*ima-3* (RNAi), $n = 3$). Alle Aufnahmen entstanden bei einer Temperatur von 22,5 °C und einer Zeitauflösung von 30 s. Die Auswertung erfolgt weiterhin für die ersten 42 während der Embryogenese vorhandenen Zellen, d.h. für die ersten fünf Generationen der *AB*-Linie, die jeweils ersten beiden Generationen der *MS*- und *C*-Linie, *EMS*, *E* sowie P_1 bis P_3 . Da Aufnahmen von Embryonen ohne Chitinhülle aufgrund der zeitaufwändigen Probenvorbereitung generell erst im zweizelligen Zustand starteten, können hier die Zellen *AB* und P_1 nicht ausgewertet werden.

Für alle untersuchten Kerne zeigt sich deutlich ein Anwachsen der Histonanordnung während der Interphase. In Abb. 3.15a ist dies exemplarisch für die Zelle P_2 in einem ungestörten Embryo als Zeitreihe gezeigt. Der Zeitnullpunkt $t = 0$ liegt hier auf dem Eintritt in die Anaphase. Da sich die Kernmembran erst während der darauffolgenden Telophase bildet [17], müssen folglich die ersten Bildstapel für die Auswertung verworfen werden. Bei allen Aufnahmen bei 22,5 °C wurde die zu verwerfende Zeitspanne auf 2 min festgesetzt (wie später in dieser Arbeit gezeigt wird, ist die Dauer der Mitose unabhängig von der Zellgröße und damit für alle Zellen ungefähr gleich, vgl. Kap. 3.5). Dies korrespondiert

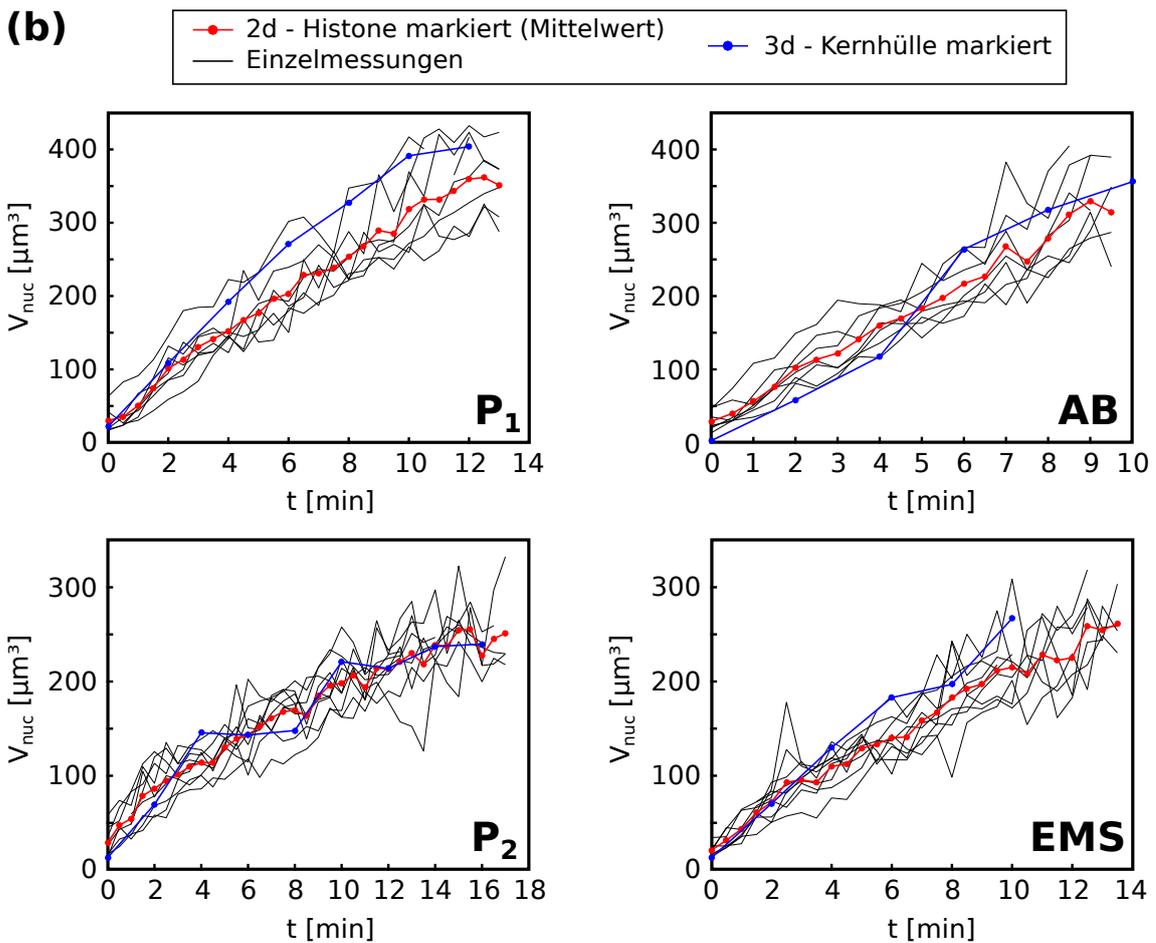
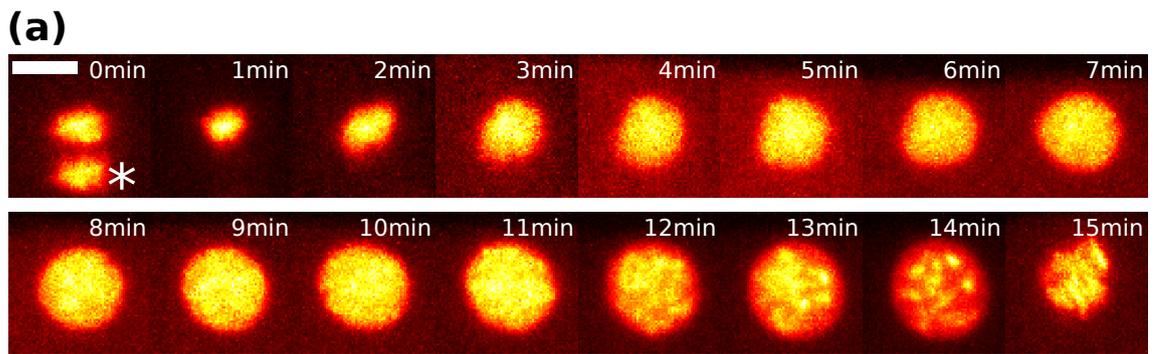


Abbildung 3.15.: Zeitliche Entwicklung der Zellkernvolumina. **(a)** Zeitreihe des Nukleus der Zelle P_2 in einem ungestörten Embryo der Linie OD95. Die Einzelbilder haben einen zeitlichen Abstand von 1 min. Bei $t = 0$ min tritt die Mutterzelle P_1 in die Anaphase ein, die Tochterchromatid-Ansammlung der Zelle C ist noch zu sehen (*). Die Mitose von P_2 beginnt bei etwa 12 min. Längenskala $5 \mu\text{m}$. **(b)** Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der Zellkernvolumina in den Zellen P_1 (oben links), AB (oben rechts), P_2 (unten links) und EMS (unten rechts) in ungestörten Embryonen der Linie OD95. Es sind jeweils die Einzelmessungen in $n = 9$ Embryonen (schwarz) sowie die daraus berechneten Mittelwerte (rot) mit einer Zeitauflösung von 30 s dargestellt. Die Volumina wurden mit dem in Kap. 2.2.3 vorgestellten, zweidimensionalen Verfahren bestimmt. Zum Vergleich sind Daten von T. Ozawa und A. Kimura für dieselben Zellen eingetragen (blau, Erlaubnis erteilt). Diese wurden anhand von dreidimensionalen Bildern kernmembranmarkierter Embryonen ($n = 3$) durch dreidimensionale, manuelle Segmentierung bei einer Zeitauflösung von 120 s gewonnen. Die gute Übereinstimmung rechtfertigt den hier gewählten Ansatz.

ungefähr mit dem Zeitpunkt, ab dem aus den flachen Chromatinanordnungen der Meta- und Anaphase wieder runde Interphasenkerne werden.

In Abb. 3.15b ist die zeitliche Entwicklung der Nukleusvolumina für die vier Zellen P_1 , AB , P_2 und EMS in ungestörten Embryonen gezeigt. Der Zeitnullpunkt wurde hier bereits auf 2 min nach Eintritt in die Anaphase gelegt. Schwarze Linien repräsentieren Messungen in einzelnen Embryonen, das gemittelte Volumen ist in rot dargestellt (Punkte, dazwischen lineare Interpolation). Die Messungen in einzelnen Embryonen zeigen starke zeitliche Schwankungen. Diese sind wahrscheinlich auf Messfehler, d.h. Fehler bei der Segmentierung der Zellkerne, zurückzuführen. Durch die Verwendung der über alle Embryonen gemittelten Werte werden diese Schwankungen effektiv reduziert und es ergeben sich nahezu monoton steigende Zellkernvolumina.

Um die oben angesprochene Annahme, dass die Histone das Kernvolumen vollständig ausfüllen, zu überprüfen, sind in Abb. 3.15b auch Daten von T. Ozawa und A. Kimura mit eingetragen (blaue Punkte, dazwischen lineare Interpolation, Abbildung mit deren Erlaubnis). Diese haben zur Volumenbestimmung der Zellkerne einen anderen Ansatz gewählt. Sie verwenden eine Fluoreszenzmarkierung an der Kernmembran (GFP::MAN-1), um diese mit einem Spinning-Disk-Mikroskop dreidimensional aufzunehmen. Die Segmentierung zur Volumenbestimmung erfolgt dreidimensional und vollständig manuell. Somit sind keine weiteren Annahmen nötig, um die Zellkernvolumina zu erhalten. Aufgrund des hohen Bleichens (konfokale Mikroskopie) ist hier die Zeitauflösung kleiner und beträgt 120 s. Insgesamt wurden so bisher $n = 3$ Embryonen ausgewertet. Beide Datensätze stimmen im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeit überein (vgl. hierzu die Streuung der Einzelmessungen), so dass das hier entwickelte Vorgehen die tatsächlichen Zellkernvolumina gut bestimmen kann.

An dieser Stelle kann auch der oben angesprochene Zusammenhang zwischen Zell- und Kernvolumen validiert werden, der von Arata *et al.* publiziert wurde [107]. Laut dieser Studie gilt $V_{nuc} \propto V_{zelle}^{0,63}$. Zur Überprüfung wurde von allen untersuchten Zellen bei allen Konditionen aus den jeweils letzten drei Bildstapeln, die die Zelle in Interphase zeigen, das mittlere Nukleusvolumen bestimmt. Hierzu wurden die bereits gemittelten Zellkernvolumina (rot in Abb. 3.15b) verwendet. Die sich somit ergebenden Daten als Funktion der Zellgröße sind in Abb. 3.16a nach Kondition und Zelllinie aufgeschlüsselt dargestellt (Zellvolumina gemäß Kap. 3.2.1). Es zeigt sich eine klare Korrelation zwischen Zell- und Zellkernvolumen. Diese scheint sowohl von der Zugehörigkeit zu einer Zelllinie, als auch von der Kondition (ungestört, ohne Chitinhülle, RNAi-behandelt) unabhängig zu sein. Der Zusammenhang kann gut durch ein Potenzgesetz $V_{nuc} = a \cdot V_{zelle}^b$ beschrieben werden (gestrichelte Linie in Abb. 3.16a, logarithmischer Fit an Daten aller vier Konditionen, $r^2 = 0,91$). Für den Parameter b ergibt sich ein Wert von 0,63, in Übereinstimmung mit dem von Arata *et al.* publizierten Wert.

Der nichtlineare, allometrische Zusammenhang zwischen Zell- und Zellkernvolumen am Ende der Interphase bedeutet, dass auch die Kern-Plasma-Relation KPR zu dieser Zeit nicht konstant ist. Aus den Messgrößen V_{zelle} und V_{nuc} kann das Verhältnis aus Kern- und Cytoplasmavolumen gemäß $KPR = V_{nuc}/(V_{zelle} - V_{nuc})$ berechnet werden. Die Ergebnisse sind, ebenso nach Zelllinie und Kondition aufgeschlüsselt, in Abb. 3.16b dargestellt. Während bei großen Zellen am Anfang der Entwicklung der Zellkern selbst am Ende der Interphase nur etwa 2% der gesamten Zelle ausfüllt, steigt dieser Wert bis zur Gastrulation auf über 10% an. Der Zusammenhang zwischen KPR und Zellvolumen kann ebenfalls mit einem Potenzgesetz beschrieben werden. Hier ergibt sich $KPR \propto V_{zelle}^{-0,39}$ (gestrichelte Linie in Abb. 3.16b, logarithmischer Fit an Daten aller vier Konditionen, $r^2 = 0,77$).

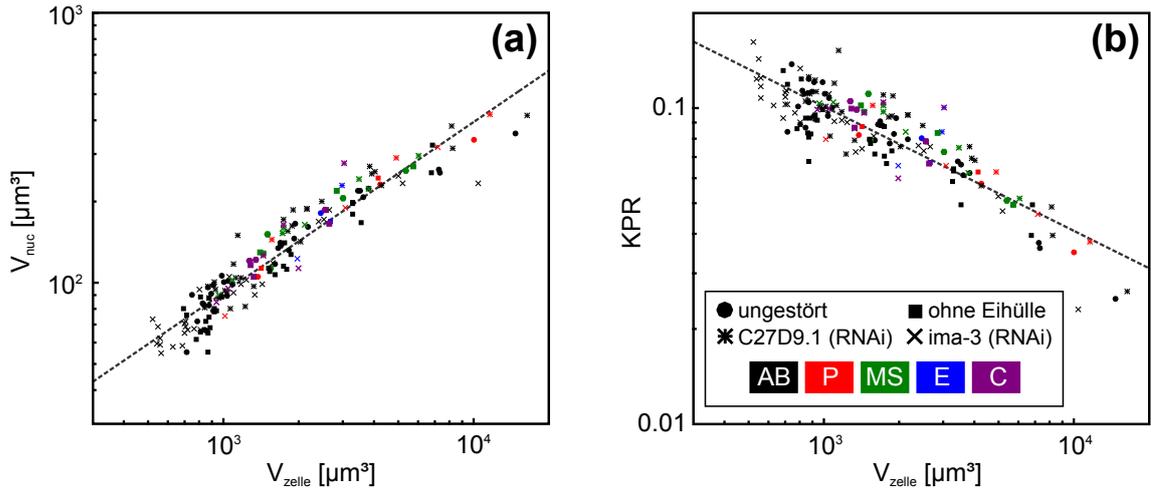


Abbildung 3.16.: Nukleusvolumina und Kern-Plasma-Relationen am Ende der Interphase. (a) Die Zellkernvolumina am Ende der Interphase korrelieren mit dem Zellvolumen. Der Zusammenhang kann durch ein Potenzgesetz $V_{nuc} \propto V_{zelle}^{0,63}$ beschrieben werden (gestrichelte Linie). (b) Die Kern-Plasma-Relation KPR am Ende der Interphase hängt ebenfalls vom Zellvolumen ab, es gilt $KPR \propto V_{zelle}^{-0,39}$. Die gezeigten Daten in (a) & (b) entsprechen dem mittleren Nukleusvolumen der jeweils letzten drei Bildstapel, die die Zellen in Interphase zeigen (gemittelt über alle untersuchten Embryonen). Die Darstellung ist nach Kondition (●: ungestört, ■: ohne Eihülle, *: größere Embryonen, C27D9.1 (RNAi), ×: kleinere Embryonen, ima-3 (RNAi)) und Zelllinie (schwarz: AB, rot: P, grün: MS, blau: E, lila: C) aufgeschlüsselt. Die Skalierung erscheint in beiden Fällen von Kondition und Zelllinie unabhängig.

Um den allometrischen Zusammenhang zwischen V_{nuc} und V_{zelle} am Ende der Interphase zu verstehen, soll im Folgenden die Wachstumsdynamik der Zellkerne näher untersucht werden. Wie bereits gezeigt wurde, kann innerhalb der auftretenden Schwankungen keine Abhängigkeit der Nukleusgröße von der Zelllinie festgestellt werden. Dies gilt analog auch für alle folgenden Ergebnisse. Auf eine Unterscheidung nach Zelllinien-Zugehörigkeit wird daher aus Gründen der Übersichtlichkeit in den nächsten Unterkapiteln generell verzichtet.

Wachstumsdynamik ist exponentieller Natur

Gesucht wird ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Nukleusgröße V_{nuc} und der Zeit nach Eintritt in die Interphase. Aus den oben geschilderten Gründen wird auch hier der Zeitnullpunkt auf 2 min nach Beginn der Anaphase gelegt und die Nukleusgröße erst ab dort ausgewertet. Weiterhin werden im Folgenden nur noch über alle untersuchten Embryonen gemittelte Werte verwendet (d.h. die in Abb. 3.15b rot dargestellten Daten).

Wie sich zeigt, kann das zeitliche Anwachsen der Zellkerne durch eine exponentiell sättigende Funktion der Art

$$V_{nuc}(t) = V_0 + V_1 \left(1 - e^{-t/\tau}\right) \quad (3.17)$$

beschrieben werden. Die Funktion verfügt über drei freie Fitparameter V_0 , V_1 und τ . In Abb. 3.17 sind die zeitabhängigen Nukleusvolumina und deren Beschreibung durch Gl. 3.17 für 14 Zellen beispielhaft abgebildet. Die funktionale Form von Gl. 3.17 ist vorerst rein heuristischer Natur. Sie wird deshalb verwendet, weil sie die Daten gut beschreibt und außerdem die Parameter einer intuitiven Interpretation zugänglich sind. Während V_0 das Volumen des Zellkerns zu Beginn der Interphase beschreibt, ist V_1 das Volumen, um das der Zellkern wächst bzw. wachsen würde, wenn er hinreichend lange Zeit hätte (siehe unten). τ gibt die Zeitskala des Wachstums an.

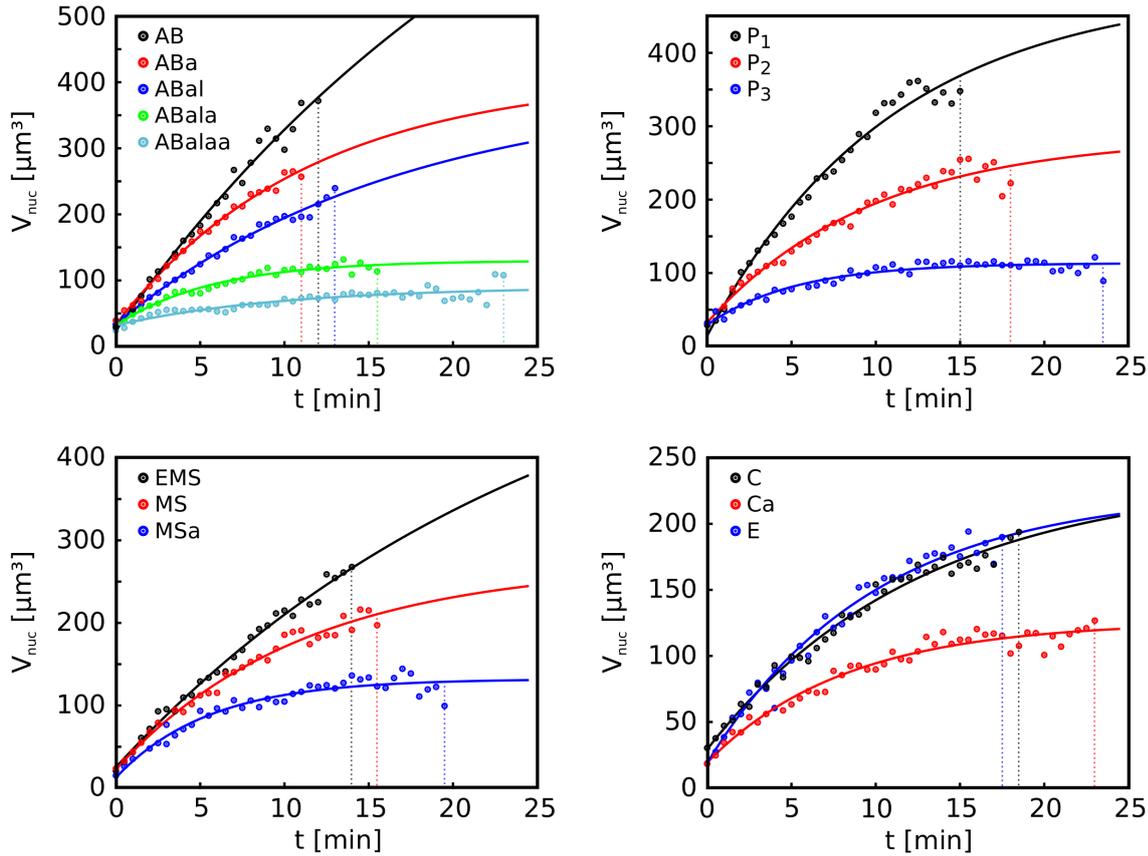


Abbildung 3.17.: Exponentielle Fits beschreiben zeitabhängige Nucleusvolumen. Dargestellt sind die zeitabhängigen, über alle Embryonen gemittelten Zellkernvolumina für 14 beispielhaft ausgewählte Zellen (Punkte) sowie daran angepasste Kurven gemäß Gl. 3.17 (Linien). Senkrechte gestrichelte Linien markieren den Eintritt der jeweiligen Zelle in die *M*-Phase.

In Abb. 3.17 ist für jede Zelle zusätzlich der Beginn der Mitose eingetragen, bis zu welchem die Nucleusgrößen ausgewertet werden können (senkrechte gestrichelte Linien, etwa Mitte der Prophase). Ab dort beginnen die Chromosomen zu kondensieren und fallen schließlich in der Metaphasen-Platte zusammen, das beobachtbare Chromatinvolumen nimmt ab und die Kernmembran löst sich schließlich auf. Hier sei auf zwei wichtige Beobachtungen hingewiesen: erstens treten große Zellen früher in die Mitose ein als kleine, es liegt also eine Antikorrelation zwischen Zellvolumen und Interphasendauer vor. Dies ist Gegenstand des Kap. 3.5. Zweitens erreichen gerade Zellkerne großer Zellen daher nicht das durch Gl. 3.17 vorhergesagte finale Volumen $V_0 + V_1$. Hierauf wird weiter unten näher eingegangen.

Abhängigkeit der Fitparameter vom Zellvolumen

Die Abhängigkeit der drei Fitparameter V_0 , V_1 und τ vom Zellvolumen ist in Abb. 3.18 für alle vier Konditionen dargestellt. Für große Zellen, in welchen das Zellkernvolumen während der gesamten Interphase relativ linear ansteigt (siehe z.B. *AB* in Abb. 3.17), sind die Werte der Parameter beim Fitten instabil, insbesondere V_1 und τ . Die Ergebnisse wurden daher auf unrealistische Werte untersucht und solche als Ausreißer verworfen. Als Kriterium wurde $V_1 > 2500 \mu\text{m}^3$ festgesetzt (heuristischer Wert). Demnach werden die Parameter der Zellen *AB*, *ABa* und *C* in C27D9.1 (RNAi) Embryonen nicht weiter verwendet. Zu-

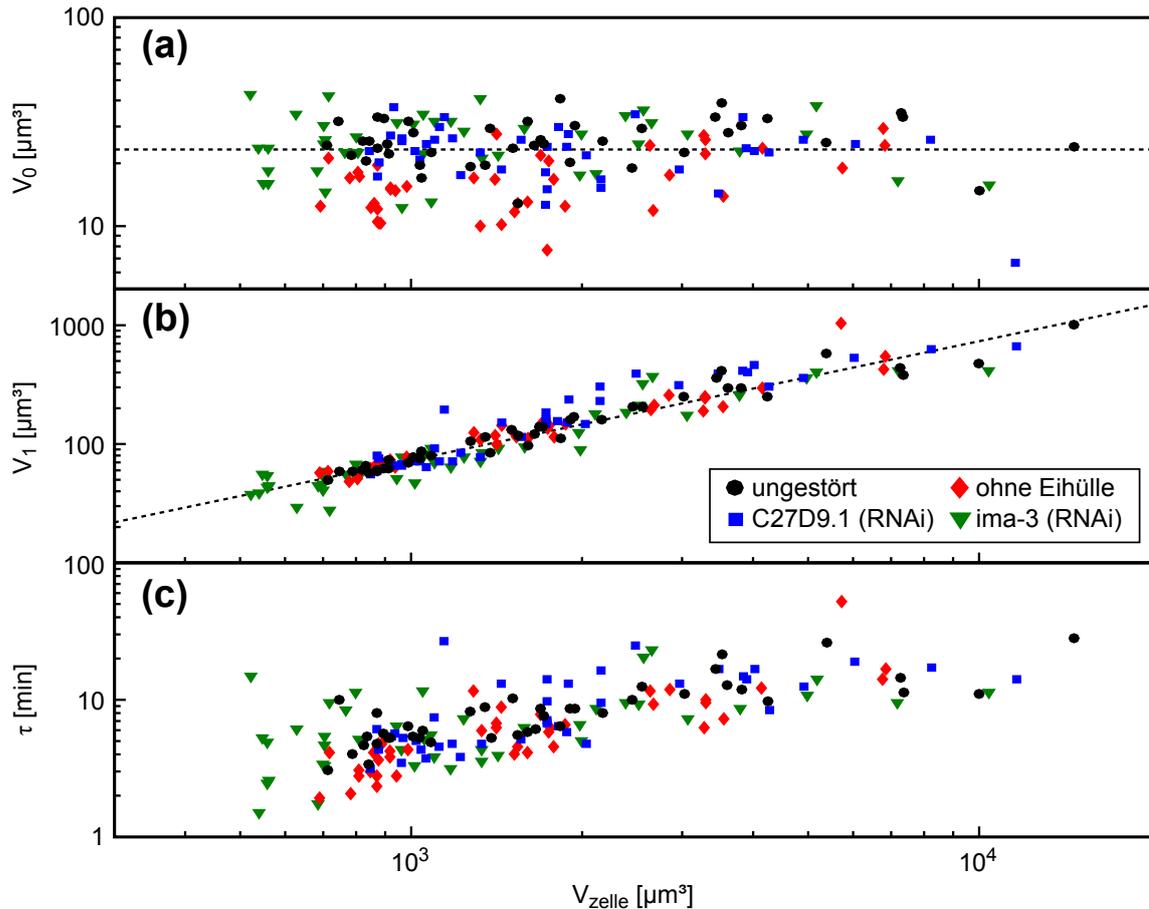


Abbildung 3.18.: Abhängigkeit der Fitparameter vom Zellvolumen. (a) Der Parameter V_0 zeigt keine Abhängigkeit von Zellvolumen oder Kondition (schwarze Kreise: ungestörte Embryonen, rote Rauten: ohne Chitinhülle, blaue Quadrate: C27D9.1 (RNAi), grüne Dreiecke: ima-3 (RNAi)). Der Korrelationskoeffizient zwischen V_0 und V_{zelle} beträgt 0,027. Der Mittelwert $\langle V_0 \rangle$ (gemittelt über Daten aller vier Konditionen) beträgt $23,09 \mu\text{m}^3$ (gestrichelte Linie) und ist von der erwarteten Größenordnung des minimal möglichen Kernvolumens (siehe Text). (b) Der Parameter V_1 zeigt zum Zellvolumen einen linearen Zusammenhang ($V_1 = 0,073 \cdot V_{zelle}$ (gestrichelte Linie), Korrelationskoeffizient 0,88). (c) Der Parameter τ zeigt eine positive, aber nichtlineare Korrelation mit dem Zellvolumen (Korrelationskoeffizient 0,58), d.h. kleine Zellen haben eine größere Wachstumsrate $1/\tau$. Die Streuung ist relativ groß, ein Einfluss der Kondition auf die Skalierung ist nicht erkennbar.

dem fehlen, wie bereits angesprochen, Werte der Zellen AB und P_1 in Embryonen ohne Eihülle.

Der Fitparameter V_0 zeigt keinerlei Abhängigkeit von der Zellgröße (siehe Abb. 3.18a). Ebenfalls scheint die Kondition keinen signifikanten Einfluss auf V_0 zu haben. Der Korrelationskoeffizient zwischen V_0 und dem Zellvolumen beträgt 0,027, wobei zur Berechnung die Daten aller vier Konditionen verwendet wurden. Der Mittelwert aller V_0 ist $23,09 \mu\text{m}^3$ (gestrichelte Linie in Abb. 3.18a), bei einer Standardabweichung von $7,6 \mu\text{m}^3$. In der Einleitung dieses Kapitels wurde bereits erwähnt, dass einzelne Chromosomen während der Mitose im kondensierten Zustand eine Länge von (2-3) μm und eine Breite von etwa $0,6 \mu\text{m}$ haben [104]. Bei insgesamt zwölf, hier als Zylinder angenommenen Chromosomen pro Zellkern ergibt sich so ein chromosomales Gesamtvolumen von etwa $10 \mu\text{m}^3$. Da die Packungsdichte der Chromosomen sicher kleiner als eins ist, die Chromosomen den Zellkern also selbst im dichtest-möglichen Zustand nicht komplett ausfüllen können, ist die erwartbare Mindestgröße des Zellkerns bei der gegebenen DNA-Menge etwas größer als die

oben angegebenen $10 \mu\text{m}^3$. Die hier erhaltenen $\langle V_0 \rangle \approx 20 \mu\text{m}^3$ stimmen mit der erwarteten Mindestgröße (für eine Packungsdichte von etwa 50 %) überein und geben einen Hinweis darauf, dass sich die Zellkerne nach erfolgter Mitose annähernd in ihrem kleinstmöglichen Zustand bilden.

Nach der Bildung der Zellkerne folgt ihr Wachstum, welches durch die beiden Parameter V_1 und τ beschrieben wird. Die Skalierung von V_1 mit der Zellgröße ist in Abb. 3.18b dargestellt. Der Parameter zeigt einen linearen Zusammenhang mit V_{zelle} , der durch $V_1 = 0,073 \cdot V_{zelle}$ (Fit an Daten aller vier Konditionen, gestrichelte Linie in Abb. 3.18b, $r^2 = 0,77$) beschrieben werden kann. Der Korrelationskoeffizient zwischen V_1 und V_{zelle} beträgt 0,88. Die Kondition hat hier ebenfalls keinen Einfluss auf die Skalierung, allerdings durchaus auf die Werte einzelner Fitparameter (genetisch verkleinerte/vergrößerte Zellen haben auch kleinere/größere Parameter V_1 , diese werden aber weiterhin durch den linearen Fit beschrieben).

Der Parameter τ zeigt eine relativ breite Streuung. Er ist in großen Zellen tendenziell größer als in kleinen, der Korrelationskoeffizient zwischen τ und V_{zelle} beträgt 0,58. Eine Abhängigkeit der Skalierung von der Kondition ist auch hier nicht feststellbar. Ebenso kann der Zusammenhang zwischen τ und V_{zelle} nicht befriedigend durch einen einfachen funktionalen Zusammenhang (z.B. ein Potenzgesetz) beschrieben werden. Die positive Skalierung bedeutet, dass Zellkerne kleiner Zellen eine größere Wachstumsrate $1/\tau$ aufweisen als solche großer Zellen, ihre finale Größe also nach kürzerer Zeit erreichen. Dies ist folglich ein weiterer Grund, warum Zellkerne in großen Zellen das Volumen $V_0 + V_1$ im Gegensatz zu solchen in kleinen Zellen nicht erreichen. Neben der bereits angesprochenen Tatsache, dass die Interphase in solchen Zellen kürzer ist, ist dort auch das Wachstum des Zellkerns langsamer.

Die Skalierung des Parameters V_1 legt bereits nahe, dass der oben angesprochene allometrische Zusammenhang zwischen V_{nuc} am Ende der Interphase und V_{zelle} keine Folge der Regulierung der Zellkerngröße, sondern der Zellzyklendauer ist. Dies wird im Folgenden analysiert.

Konstante Kern-Plasma-Relation im Langzeitlimes

Die Summe $V_0 + V_1$ der beiden Fitparameter aus Gl. 3.17 kann dahingehend interpretiert werden, dass der Zellkern gegen dieses Volumen strebt, wenn ihm dafür hinreichend viel Zeit zu Verfügung steht (die benötigte Zeit wird durch den dritte Parameter τ beschrieben). Zellkerne in großen Zellen erreichen dieses Volumen nicht. Die Größe $V_0 + V_1$ besitzt für diese Zellkerne somit nicht notwendigerweise eine tatsächliche Bedeutung. Aus zwei Gründen lohnt sich eine Untersuchung der Skalierung von $V_0 + V_1$ mit der Zellgröße dennoch. Erstens wird der zeitliche Verlauf der Zellkernvolumina während der Interphase großer Zellen durch Gl. 3.17 gut wiedergegeben. Das Wachstum des Zellkerns wird dadurch unterbrochen, dass die Zelle in die M -Phase eintritt und der Kern daraufhin zerfällt. Die Hypothese, dass der Kern bei fehlendem Eintritt in die Mitose weiterwachsen würde liegt folglich nahe. Dies wird, zweitens, durch die Beobachtung gestützt, dass Nuklei kleinerer Zellen, bei welchen die Interphase deutlich länger dauert, tatsächlich ein gesättigtes Volumen $V_0 + V_1$ erreichen.

Die aus den Parametern V_0 und V_1 extrapolierten Nukleusvolumina im Langzeitlimes, d.h. $V_0 + V_1$, sind in Abb. 3.19a gegen das Zellvolumen aufgetragen. Zusätzlich sind dort nochmals die Nukleusvolumina am Ende der Interphase dargestellt (vgl. Abb. 3.16a). Die Daten stammen aus Messungen unter allen vier Konditionen. Auf eine Unterscheidung wurde hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Der Korrelationskoeffizient zwischen V_{zelle} und $V_0 + V_1$ beträgt 0,88. Die extrapolierten Volumina $V_0 + V_1$ können daher in

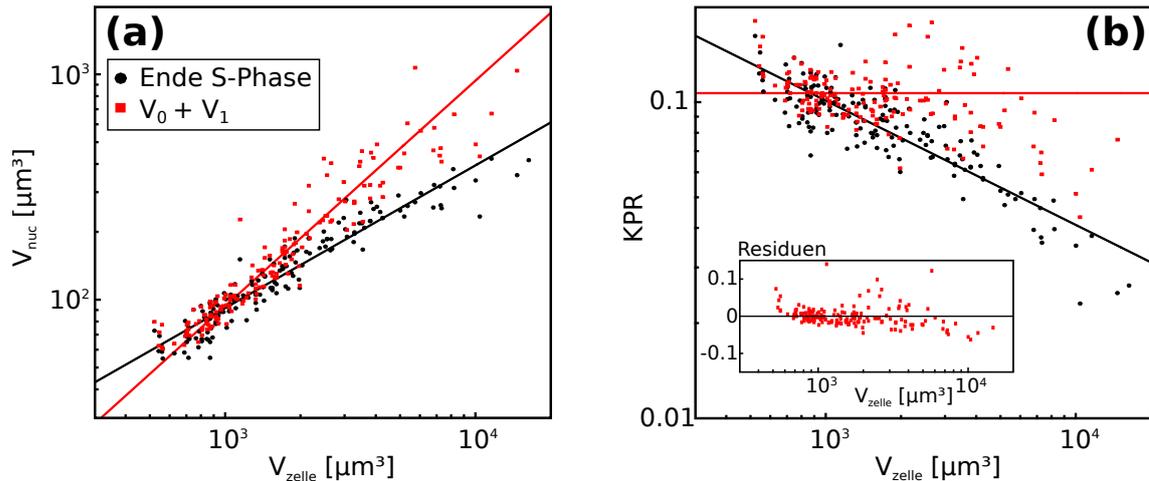


Abbildung 3.19.: Skalierung der Nukleusvolumina und KPR im Langzeitlimit. (a) Dargestellt sind die Nukleusvolumina am Ende der Interphase als Funktion der Zellgröße (schwarze Punkte, alle Konditionen). Die Daten können durch ein Potenzgesetz mit dem Exponenten 0,63 beschrieben werden (schwarze Linie, siehe Abb. 3.16a). Zusätzlich sind die extrapolierten Nukleusvolumina nach langer Zeit, wie sie von Gl. 3.17 vorhergesagt werden abgebildet, d.h. $V_0 + V_1$ (rote Quadrate, alle Konditionen). Der Zusammenhang mit dem Zellvolumen kann durch eine lineare Funktion gut wiedergegeben werden. Es gilt $V_0 + V_1 = 0,094 \cdot V_{zelle}$ (rote Linie). (b) Die Kern-Plasma-Relation KPR am Ende der Interphase hängt gemäß einem Potenzgesetz von der Zellgröße ab (schwarze Punkte und Linie, vgl. Abb. 3.16b). Werden zur Berechnung der KPR die extrapolierten Nukleusvolumina verwendet, d.h. $KPR = (V_0 + V_1)/(V_{zelle} - V_0 - V_1)$, so verschwindet die Abhängigkeit vom Zellvolumen (rote Quadrate). Die Daten können, mit Ausnahme sehr großer oder kleiner Zellen, ohne systematische Abweichung durch eine Konstante beschrieben werden ($KPR = 0,107$, rote Linie, vgl. Residuenplot, Einfügung).

einen linearen Zusammenhang mit dem Zellvolumen gebracht werden. Die mit eingezeichnete Fitfunktion ist $V_0 + V_1 = 0,094 \cdot V_{zelle}$ (logarithmischer Fit, $r^2 = 0,89$). Hier entsteht ein Widerspruch: die beiden Größen V_1 und $V_0 + V_1$ können nicht gleichzeitig in einem strikt linearen Zusammenhang mit dem Zellvolumen stehen. Im Rahmen der auftretenden Schwankungen kann jedoch nicht entschieden werden, für welche der genannten Größen dieser lineare Zusammenhang tatsächlich angemessen ist.

Ein linearer Zusammenhang zwischen $V_0 + V_1$ und dem Zellvolumen bedeutet, dass die Kern-Plasma-Relation einem konstanten Wert zustrebt. In Abb. 3.19b sind neben den Daten aus Abb. 3.16b zusätzlich die extrapolierten Werte $KPR = (V_0 + V_1)/(V_{zelle} - V_0 - V_1)$ eingetragen. Wie man erkennt, können diese im Rahmen der Streuung mit hinreichender Genauigkeit als konstant angenommen werden. Systematische Abweichungen treten nur bei sehr großen Zellen (bei welchen die Parameter V_1 instabil sind, siehe oben) und bei kleinen Zellen auf (siehe unten). Als Mittelwert ergibt sich $\langle KPR \rangle = 0,107$, d.h., nach hinreichend langer Interphase wäre das Verhältnis zwischen nuklearem und cytoplasmischem Volumen konstant bei etwa 10 %.

Dieser Zusammenhang hat weitreichende Konsequenzen für eine mögliche Erklärung der Regulierung der Zellkerngrößen, da hierdurch Ansätze wahrscheinlich werden, die auf limitierenden Komponenten aufbauen. Hierauf wird weiter unten detailliert eingegangen.

Wachstumsdynamik ist nicht temperaturabhängig

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurde der Einfluss der Zellgröße auf die Wachstumsparameter V_0 , V_1 und τ untersucht. An dieser Stelle soll nun die Temperaturabhängigkeit dieser Parameter gemessen werden. Dies geschieht an Aufnahmen von Embryonen

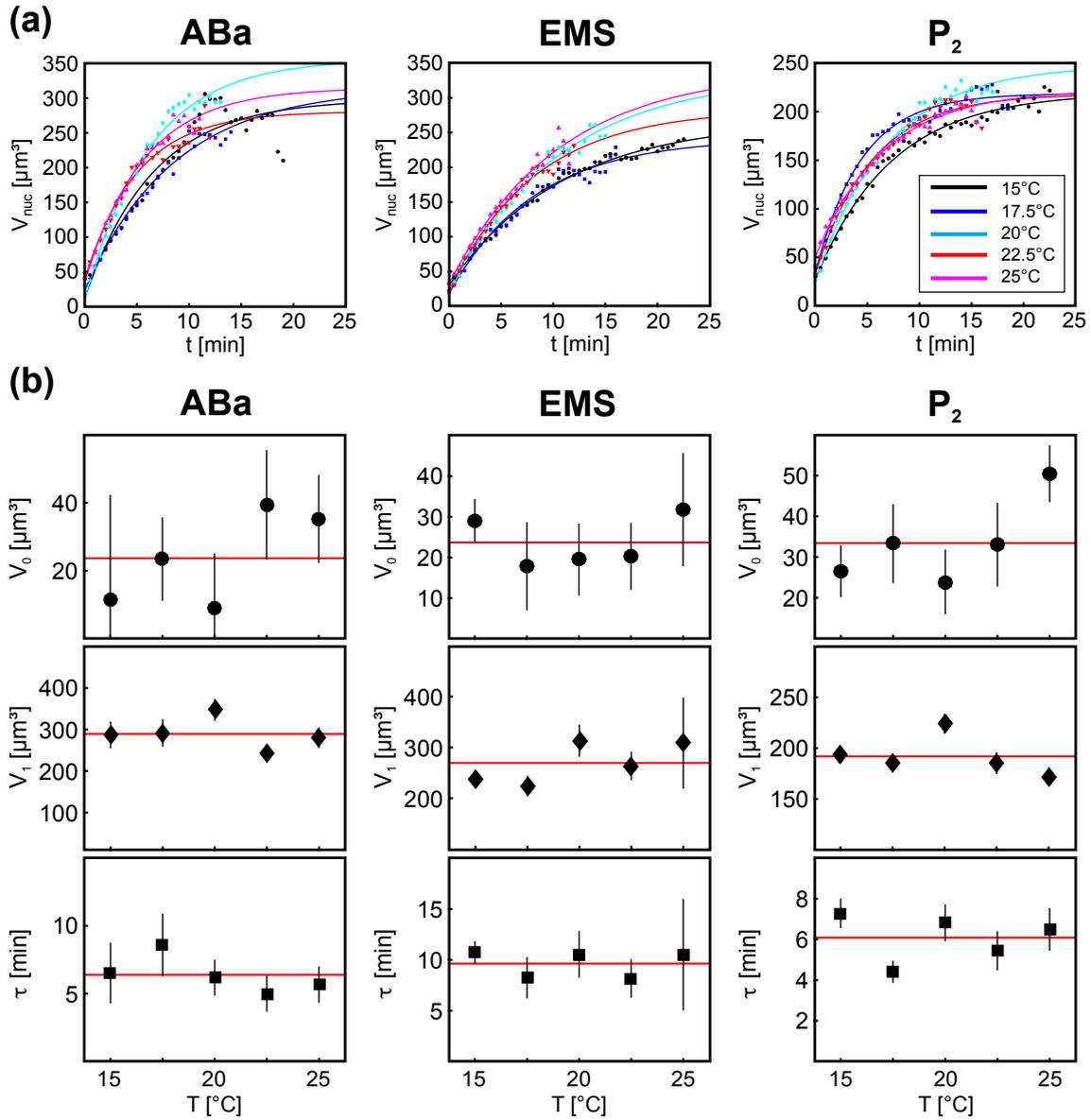


Abbildung 3.20.: Temperaturabhängige Messung der Wachstumsdynamik. (a) Dargestellt sind die zeitabhängigen Zellkernvolumina (Punkte) der Zellen *ABa* (links), *EMS* (Mitte) und *P₂* (rechts) für die Temperaturen 15 °C (schwarz), 17,5 °C (blau), 20 °C (cyan), 22,5 °C (rot), 25 °C (magenta). Fitkurven nach Gl. 3.17 sind mit eingetragen. (b) Die drei Parameter V_0 (obere Reihe), V_1 (mittlere Reihe) und τ (untere Reihe) zeigen für keine der drei untersuchten Zellen eine systematische Abhängigkeit von der Temperatur. Fehlerbalken entsprechen den 95 %-Konfidenzintervallen der Fitparameter, rote Linien den über alle Temperaturen gemittelten Werten.

der Linie XA3501, welche neben einer GFP-Markierung an den Histonen über ebenfalls GFP-markiertes Tubulin verfügen. Wegen dieser Doppelmarkierung ist eine automatisierte Messung der Nukleusvolumen nicht möglich, weshalb sie für diese Aufnahmen vollständig manuell erfolgte. Das Vorgehen ist in Kap. 2.2.3 beschrieben. Es wurden drei Zellen ausgewertet, nämlich *ABa*, *EMS* und *P₂*. Alle drei Zellen existieren im vierzelligen Zustand, sind also relativ groß. Da somit das absolute Nukleuswachstum groß ist (vgl. Skalierung des Parameters V_1), steigt die relative Genauigkeit der Daten.

Die Wachstumsdynamik wird bei insgesamt fünf Temperaturen ausgewertet, diese sind 15 °C ($n = 7$ Embryonen), 17,5 °C ($n = 5$), 20 °C ($n = 8$), 22,5 °C ($n = 10$) und 25 °C

($n = 10$). Über alle Embryonen gemittelte Nukleusvolumina als Funktion der Zeit sind für alle Temperaturen und Zellen in Abb. 3.20a abgebildet. Zusätzlich finden sich dort die Fitkurven gemäß Gl. 3.17. Die aus den Fits resultierenden Parameter V_0 , V_1 und τ sind in Abb. 3.20b gegen die Temperatur aufgetragen.

Für keinen der drei Parameter kann eine konsistente Abhängigkeit von der Temperatur festgestellt werden. Während dies für V_0 und V_1 zu erwarten war (das Anfangs- und Endvolumen der Zellkerne steht wahrscheinlich in Beziehung zu einer Molekülanzahl, siehe unten), ist dies für die Zeitparameter τ ein bemerkenswertes Ergebnis. Alle anderen hier untersuchten Prozesse skalieren exponentiell mit der Temperatur, wie dies für biochemisch ratenlimitierte Prozesse üblich ist (Arrhenius-Skalierung, siehe Kap. 3.1.1 & Kap. 3.5).

Mögliche Erklärungsansätze

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden alle bisher gesammelten Daten bezüglich der Zellkernvolumina dargelegt. An dieser Stelle sollen einige mögliche Erklärungsansätze für die Skalierung der Parameter V_0 , V_1 und τ gegeben und diskutiert werden.

Die Daten legen dabei einen Mechanismus nahe, der im Wesentlichen nur von der Zellgröße abhängt. Die Skalierung der Fitparameter V_0 , V_1 und τ hängt nicht signifikant von der Zelllinie ab, d.h., es gibt keinen Unterschied zwischen Keimbahn- und somatischen Zellen. Auch äußere, mechanische Effekte spielen keine Rolle (siehe Daten ohne Eihülle). Des Weiteren ändern sich die Nukleusgrößen, wenn die Zellgrößen genetisch vergrößert oder verkleinert werden (RNAi-Daten), jedoch weicht die Skalierung nicht von der ungestörter Embryonen ab.

Limitierende Komponenten zur Erklärung finaler Nukleusvolumina. Die Tatsache, dass die extrapolierten, finalen Zellkernvolumina $V_0 + V_1$ linear mit dem Zellvolumen skalieren legt einen auf limitierenden Komponenten basierenden Mechanismus nahe. Bisher ist die Identität der limitierenden Spezies nicht bekannt, daher bleibt die Diskussion vorerst allgemeiner Natur.

Es wird angenommen, dass es eine zum Aufbau des Zellkerns benötigte Molekül-/Proteinfamilie χ gibt, die nur in endlicher Stückzahl vorliegt (die folgende Diskussion kann ohne Weiteres auf mehrere relevante Spezies erweitert werden). Jedes einzelne Molekül dieser Sorte kann zu dem Kernvolumen einen elementaren Beitrag V_{elem} beisteuern. Sind in einer Zelle N Kopien dieses Moleküls χ vorhanden, kann der Kern folglich bis zu einer maximalen Größe $V_{nuc,max} = N \cdot V_{elem}$ wachsen.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass während der frühen Embryogenese Transkription und in Folge dessen die Produktion neuer Proteine nur eine untergeordnete Rolle spielt [55, 57–59]. Dies bedeutet, dass die im gesamten Embryo vor der Gastrulation vorhandene Anzahl N_0 der volumenlimitierenden Moleküle χ in guter Näherung als konstant angenommen werden kann.

Zellen in *C. elegans* durchlaufen eine sog. offene Mitose, d.h., während der Mitose disassembliert die Kernmembran [17]. Während dieser Zeit kann sich somit Kern- und Cytoplasma gut durchmischen. Nach dem Zerfall der Kernmembran werden daher die Moleküle χ als im Cytoplasma gelöst angenommen. Die einfachste Annahme ist in diesem Fall, dass während der Cytokinese die Konzentration c_χ in der gesamten Zelle uniform ist. Für die in die Tochterzellen partitionierten Anzahlen von χ bedeutet dies wiederum, dass sie gemäß dem geometrischen Teilungsverhältnis (siehe Kap. 3.3) verteilt sind. Die Anzahl pro Zelle ist somit ungefähr $N \approx N_0 \cdot \frac{V_{zelle}}{V_{embryo}}$.

Zusammen mit der oben gemachten Annahme folgt damit das maximal erreichbare Zellkernvolumen als Funktion der Zellgröße,

$$V_{nuc,max} = \frac{N_0 V_{elem}}{V_{embryo}} V_{zelle}. \quad (3.18)$$

Gemäß dieses Modells würde folglich eine lineare Skalierung des finalen Kernvolumens mit dem Zellvolumen erwartet. Da $V_0 + V_1 \equiv V_{nuc,max}$, ist dies mit den experimentellen Daten konsistent (vgl. Abb. 3.19).

Hinweise auf diffusionslimitiertes Kernwachstum. Mit dem eben dargelegten *limiting component*-Modell können nur die finalen Nukleusgrößen erklärt werden, nicht jedoch die Wachstumsdynamik, die in dem Fitparameter τ kodiert ist. Aus der Annahme, dass dieses *limiting component*-Modell richtig ist, ergeben sich Konsequenzen für die Erklärung der Dynamik. Diese kann nur vom Transport der Moleküle χ in den Kern bestimmt sein. Alle anderen Prozesse, welche die Dynamik beeinflussen können (z.B. ein Schwellen des Kerns gegen Kräfte des Cytoskeletts, Schwelldruck durch DNA-Dekondensation o.ä.), haben immer auch Einfluss auf das finale Volumen. Außerdem würden solche Prozesse ein schnelleres Wachstum in größeren Zellen vorhersagen. Daher scheiden sie zur Erklärung aus.

Nach der offenen Mitose befinden sich die Moleküle χ gemäß obiger Annahme uniform verteilt im Cytoplasma (und zu einem kleineren Teil im Kern, zum Aufbau des Volumens V_0). Um zum Kernwachstum beitragen zu können, müssen sie somit erst in den Kern gelangen. Die Skalierung des Kernwachstums mit der Temperatur und der Zellgröße geben Hinweise darauf dass diese Translokalisierung diffusionslimitiert stattfindet, d.h., die Diffusion der Moleküle χ (z.B. im Cytoplasma) für die Wachstumsraten τ hauptsächlich verantwortlich ist. Wie im Folgenden klar wird, lässt sich mit dieser Annahme die Abhängigkeit von τ vom Zellvolumen einerseits und der Temperatur andererseits zwanglos erklären.

Als limitierend für das Kernwachstum wird somit die Zeitdauer angenommen, welche die Moleküle χ typischerweise benötigen, um aus dem Cytoplasma zum Kern zu gelangen. Der notwendige Transport durch die Kernporen sowie die Anlagerung im Kern geschehen demnach auf kürzeren Zeitskalen. Ferner wird angenommen, dass der cytoplasmische Transport diffusiver Natur ist.

Diffusion bezeichnet die thermisch getriebene, stochastische Bewegung mikroskopischer Teilchen (z.B. Proteine) [186, 187]. Da die Bewegung einzelner Teilchen ungerichtet ist, verschwindet das zeitliche Mittel über zurückgelegte Wegstrecken. Um die Bewegung zu charakterisieren, wird daher typischerweise die mittlere quadratische Verschiebung

$$\langle \Delta \mathbf{r}^2(\tau') \rangle = \langle (\mathbf{r}(t + \tau') - \mathbf{r}(t))^2 \rangle \quad (3.19)$$

für die Zeitintervalle τ' verwendet (gestrichene Größe, um Verwechslung mit dem Fitparameter τ vorzubeugen; \mathbf{r} sind die Teilchenpositionen zur Zeit t). Für normale Diffusion gilt Ergodizität, so dass die Mittelung sowohl als Zeit-, wie auch als Ensemblemittel ausgeführt werden kann. Es kann gezeigt werden, dass für normale Diffusion in drei Raumdimensionen

$$\langle \Delta \mathbf{r}^2(\tau') \rangle = 6D\tau' \quad (3.20)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D gilt [188]. Die von einem diffundierenden Teilchen überstrichene Fläche wächst somit linear in der Zeit (für die hier nicht behandelten Spezialfälle Sub- und Superdiffusion gelten andere Zusammenhänge). Für eine eingehende Diskussion dieses Phänomens wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen, z.B. [188].

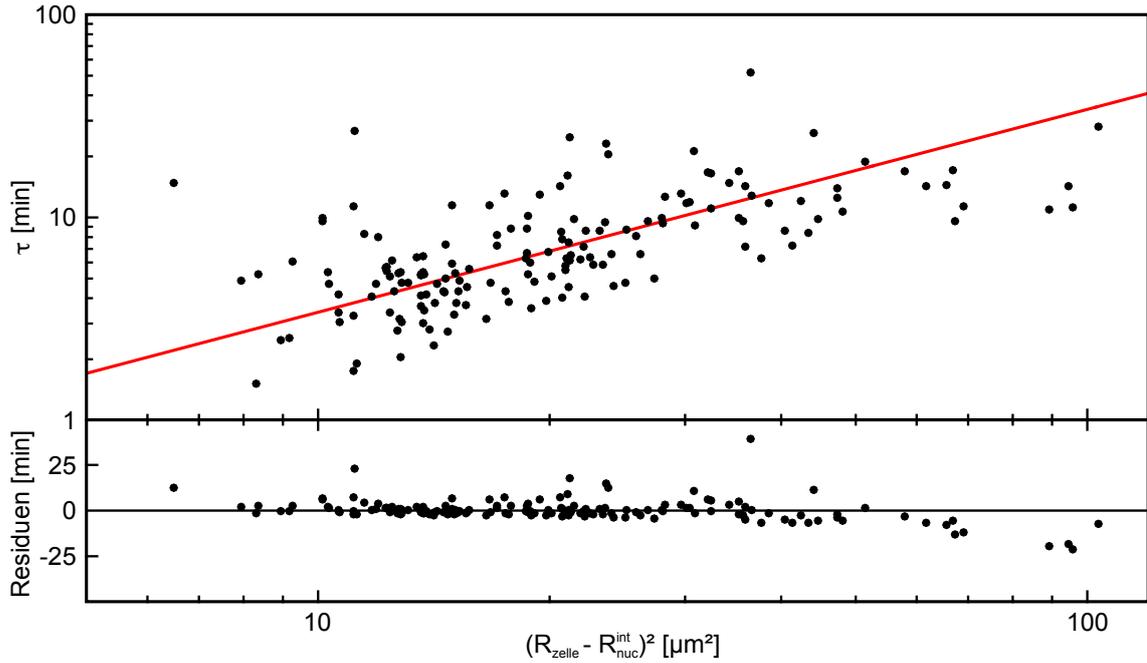


Abbildung 3.21.: Linearer Zusammenhang zwischen τ und der quadrierten cytoplasmischen Dicke. (oben) Aufgetragen sind die Zeitkonstanten τ des Zellkernwachstums gegen die quadrierte cytoplasmische Dicke $d_{cyto}^2 = (R_{zelle} - R_{nuc}^{int})^2$ (schwarze Punkte, Motivation und Berechnung von d_{cyto} siehe Text). Innerhalb der großen Streuung können die Daten durch einen linearen Zusammenhang $\tau = d_{cyto}^2 \cdot 0,34 \text{ min}/\mu\text{m}^2$ beschrieben werden (logarithmischer Fit). (unten) Die Residuen zwischen Daten und Fitkurve zeigen mit Ausnahme sehr großer Zellen keine systematischen Abweichungen.

Unter den obigen Annahmen ist sofort ersichtlich, dass kleinere Zellen relativ gesehen schneller wachsende Zellkerne besitzen: die diffusiv zurückzulegenden Wegstrecken, die mit der Dicke des Cytoplasmas skalieren, sind in diesen Zellen kleiner. Weiterhin hängt der Diffusionskoeffizient D , der die Geschwindigkeit diffusiven Transports beschreibt, nur linear von der absoluten Temperatur ab [188]. Messungen im Cytoplasma von Kulturzellen zeigen, dass sich der Diffusionskoeffizient zwischen 10°C und 37°C innerhalb der Messgenauigkeit nicht ändert [189]. Ist die Wachstumsdynamik tatsächlich diffusionslimitiert, so würde die Unabhängigkeit der Parameter τ von der Temperatur im untersuchten Bereich verständlich.

Eine mögliche Plausibilitätsprüfung der Annahme diffusionslimitierten Wachstums ist die Auftragung der typischen Zeitskala τ des Nukleuswachstums gegen die quadrierte zurückzulegende Wegstrecke. Aufgrund von Gl. 3.20 wird bei Zutreffen der Annahmen ein linearer Zusammenhang erwartet. Die Zeitskala τ entspricht in diesem Fall ungefähr der mittleren Zeitspanne, welche die Teilchen χ benötigen, um zum Kern zu gelangen, d.h. der Größe τ' in Gl. 3.20. Die quadrierte zurückzulegende Wegstrecke entspricht hingegen der mittleren quadratischen Verschiebung $\langle \Delta r^2(\tau') \rangle$ in Gl. 3.20 und ist proportional zur Dicke des Cytoplasmas. Um diese Strecke abzuschätzen werden im Folgenden alle Zellen und Kerne als Kugeln approximiert. So kann aus dem Volumen der jeweilige Radius berechnet werden. Da das Nukleusvolumen mit der Zeit steigt, wird ein intermediärer Wert $V_{nuc}^{int} = V_0 + V_1/2$ verwendet. Aus den zugehörigen Radien R_{zelle} und R_{nuc}^{int} folgt die mittlere Dicke des Cytoplasmas zu $d_{cyto} = R_{zelle} - R_{nuc}^{int}$. In Abb. 3.21 sind schließlich die Fitparameter τ gegen d_{cyto}^2 aufgetragen.

Wie man erkennt, weisen die Daten eine große Streuung auf (ca. eine Größenordnung). Innerhalb dieser Schwankungen können sie durch einen linearen Zusammenhang $\tau = d_{cyto}^2 \cdot 0,29 \text{ min}/\mu\text{m}^2$ beschrieben werden, d.h., die Residuen zeigen keine systematische Abweichung (mit Ausnahme sehr großer Zellen, vgl. Residuenplot in Abb. 3.21). Die Steigung der Geraden von $0,29 \text{ min}/\mu\text{m}^2$ entspricht (bis auf vernachlässigte Vorfaktoren) dem inversen Diffusionskoeffizienten D , der zur Erklärung der beobachteten τ nötig ist (vgl. Gl. 3.20). Daraus kann abgeleitet werden, dass D von der Größenordnung $(0,1-0,01)\mu\text{m}^2/\text{s}$ ist.

Die typischerweise für ungebundene Proteine gemessenen Diffusionskoeffizienten im Cytoplasma sind von der Größenordnung $(1-10)\mu\text{m}^2/\text{s}$ [190, 191] und liegen somit um zwei Größenordnungen über dem hier abgeleiteten. Ein diffusionsbasiertes Modell limitierender Komponenten muss in der Lage sein, diese niedrigen Diffusionskoeffizienten zu begründen.

Lamine als mögliche limitierende Proteinfamilie. In der Einleitung dieses Kapitels (Kap. 3.4.1) wurde bereits darauf hingewiesen, dass Lamine in *C. elegans* eine wichtige Rolle für die Morphologie der Nuklei spielen [17] (vgl. auch Kap. 1.1.1). Dass sie auch für die Nukleusgrößen eine Rolle spielen könnten, erscheint daher zumindest schlüssig. In zwei *Xenopus*-Spezies wurde dieser Einfluss bereits nachgewiesen [184].

Zudem ist ein niedriger Diffusionskoeffizient bei Laminen begründbar. In Kulturzellen wurde gezeigt, dass Lamine die DNA in Zellkernen räumlich stabilisieren [192]. Dies erfolgt wahrscheinlich durch eine Bindung von Lamin an die DNA, wodurch Lamine als *Crosslinker* fungieren. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Lamine auch gegenüber RNA eine hohe Affinität aufweisen. Trotz einiger Unterschiede sind sich DNA und RNA in ihren Bestandteilen (Nukleotide) relativ ähnlich. Der Diffusionskoeffizient von RNA im Cytoplasma ist von der Größenordnung $(0.005-5)\mu\text{m}^2/\text{s}$ und schließt somit den oben vorhergesagten Bereich mit ein [193].

Zusammenfassend ist ein möglicher Erklärungsansatz für die Ergebnisse dieses Kapitels der folgende: Lamine (in *C. elegans*: LMN-1) übernehmen die Rolle der oben mit χ bezeichneten Proteine (limitierende Komponente). Jedes einzelne Lamin kann also im Mittel zum Aufbau eines gewissen Kernvolumens beitragen. Da Lamine während der Mitose im Cytoplasma vorliegen [182, 183], werden sie bei Zellteilungen wie oben dargelegt gemäß der Volumenverhältnisse auf die Tochterzellen aufgeteilt. Zudem müssen sie zu Beginn der Interphase erst aus dem Cytoplasma zum Kern transportiert werden, so dass dieser wachsen kann. Der Transport geschieht diffusiv. Da Lamine eine Affinität für eine Bindung an im Cytoplasma enthaltene RNA aufweisen, binden diese häufig, so dass die Diffusion der Lamine durch die großen RNA-Moleküle effektiv verlangsamt wird. Dies führt zu Zeitskalen des Nukleuswachstums im Bereich von etwa 10 min.

3.4.3. Diskussion

Bevor die bisherigen Ergebnisse diskutiert werden, sollen sie kurz zusammengefasst werden:

- Zu Beginn der Interphase nimmt das Kernvolumen einen Wert nahe dem minimal möglichen an. Das minimal mögliche Kernvolumen entspricht hierbei dem Gesamtvolumen der kondensierten Mitosechromosomen.
- Während der Interphase wachsen die Kerne. Deren Volumen strebt exponentiell asymptotisch einem Grenzwert entgegen.

- Vor allem in frühen, großen Zellen wird dieser Grenzwert nicht erreicht, da die Zellen vorher in Mitose eintreten.
- Weiterhin hängt der Grenzwert linear vom Zellvolumen ab, so dass das Verhältnis KPR aus Kern- und cytoplasmischem Volumen bei hinreichend langer Interphase konstant wäre.
- Die Zeitskala des Kernwachstums korreliert positiv mit der Zellgröße, ist jedoch von der Temperatur unabhängig.
- Limitierende Komponenten bieten einen möglichen Ansatz, um die Grenzwerte der Nukleusvolumina zu erklären. Die Daten legen ferner nahe, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Kerne durch einen diffusiven Transportprozess festgelegt wird.

Die Ergebnisse dieses Kapitels gruppieren sich in das immer intensiver untersuchte Feld intrazellulärer Skalierungsverhalten verschiedener Organellen ein. Es wird zunehmend klarer, dass die Größe von Organellen ein wichtiger Faktor für ihre Funktionalität ist [10, 167]. Wie in der Einleitung dieses Kapitels bereits angemerkt wurde, ist die Regulierung der Organellgröße jedoch in den meisten Fällen nur unzureichend verstanden [170]. Dies zeigt sich auch daran, dass nach über fünf Jahrzehnten der Forschung an *C. elegans* über die Regulierung und Dynamik der Zellkerngrößen bisher nahezu nichts bekannt ist.

In dieser Arbeit wurden sie daher eingehend untersucht. Dabei wurde zuerst der verwendete zweidimensionale Ansatz zur Volumenbestimmung validiert, indem die gewonnenen Daten mit dreidimensional und annahmefrei bestimmten Werten von Ozawa und Kimura verglichen wurden. Zwar zeigen die Messungen dieser Arbeit in einzelnen Embryonen relativ große Schwankungen (siehe Fluktuationen in Abb. 3.15b), die wahrscheinlich auf Segmentierungsfehler zurückzuführen sind. Jedoch können diese durch eine Mittelung über alle untersuchten Embryonen effektiv unterdrückt werden. Insgesamt konnten damit zeitlich hoch aufgelöste Daten für alle Zellen früher Entwicklungsstadien gewonnen werden. In Kombination mit den Messungen von Ozawa und Kimura konnte gezeigt werden, dass die Daten die tatsächlichen Nukleusvolumina gut wiedergeben. Insbesondere bedeutet dies, dass die Chromatinanordnungen die Kernhüllen vollständig ausfüllen.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass die Zellkernvolumina exponentiell einem Grenzwert entgegen streben. Besonders in großen Zellen wird dieser Grenzwert jedoch nicht erreicht, da sie vorher in Mitose eintreten (vgl. auch Kap. 3.5). Hierdurch erklärt sich die eingangs erwähnte allometrische Beziehung $V_{nuc} \propto V_{zelle}^{0,63}$ am Ende der Interphase. Diese ist keine alleinige Folge der Wachstumsdynamik der Zellkerne, sondern eher ein Resultat der spezifischen Dauern der Interphase. Die Grenzwerte, gegen die die Nukleusvolumina streben, zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Zellgröße. Der beobachtete allometrische Zusammenhang zwischen V_{nuc} und V_{zelle} reduziert sich somit auf einen deutlich einfacher zu erklärenden isometrischen, d.h. linearen.

Mit den weiteren experimentellen Beobachtungen (Zellkerngröße zu Beginn der Interphase, Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Zellgröße, Temperaturunabhängigkeit) kann daher festgehalten werden, dass die Dynamik des Zellkernwachstums in frühen Phasen der Embryogenese des *C. elegans* in dieser Arbeit umfassend charakterisiert wurde.

Eine konkrete, biologisch fundierte Begründung der Beobachtungen im Sinne eines (quantitativen) Modells steht im Moment jedoch noch aus. Wie bereits dargelegt wurde, legen die gesammelten Daten einen Mechanismus nahe, der auf der Partitionierung von für die Zellkerngrößen kritischen Proteinen beruht (*limiting component*). Ein solcher Ansatz wird zusätzlich von den Ergebnissen von Schierenberg *et al.* gestützt, wonach sich

kleinere Nuklei bilden, wenn einer Zelle etwas Cytoplasma entfernt wird [41]. In diesem Fall wären in der Zelle weniger Moleküle χ vorhanden, wodurch auch $V_{nuc,max}$ sinkt. Die Zellgrößen- und Temperaturabhängigkeit der Wachstumsdynamik lässt sich schlüssig nur durch eine Diffusionslimitierung erklären.

Es wurde bereits angesprochen, dass die Lamina einen möglichen Ansatzpunkt für eine Konkretisierung der Modellierung darstellt. Ihre Konstituenten, die Lamine, wären in diesem Fall die limitierende Komponente. Deren notwendige langsame Diffusion müsste hierbei über eine Bindung an RNA erklärt werden. Ein experimenteller Nachweis für diese Hypothese kann bisher nicht gegeben werden. Um den Diffusionskoeffizienten von LMN-1 in *C. elegans* direkt zu messen, wurden die beiden Linien LW697 und LW709 beim CGC bestellt [26]. Beide sind stabil transfiziert und weisen eine GFP-Markierung an Lamin auf (GFP::LMN-1). Jedoch wird markiertes Lamin nicht maternal vererbt, da es in diesen Wurmlinien nur in somatischen Zellen vorhanden ist [182]. Folglich ist erst dann ein ausreichendes Fluoreszenzsignal detektierbar, wenn der Embryo markiertes Lamin selbst produziert, d.h. nach dem Einsetzen von Transkription. Signifikante Fluoreszenz tritt in beiden Linien erst ab dem etwa 60-zelligen Stadium auf. Zu dieser Zeit sind die Zellen jedoch schon zu klein, um die Diffusion im Cytoplasma präzise messen zu können. Ein konzeptueller Nachteil des (rudimentären) Lamin-Modells ist, dass anhand dessen keine Aussagen über den Funktionsmechanismus der Lamine im Kern möglich sind. Wie ein Molekül zur Bildung des Zellkernelementarvolumens V_{elem} beiträgt kann somit nicht beantwortet werden.

Neben der Beschränkung durch die Lamina stellt eine Limitierung durch die Kernmembran einen weiteren möglichen Modellierungsansatz dar, der derzeit jedoch noch nicht vollständig ausformuliert ist. Die Kernmembran wird kontinuierlich aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) rekrutiert [194]. Das ER ist ein tubuläres Netzwerk aus Doppel-lipidschichten [3]. Für die Bildung von tubulären Strukturen, d.h. Membranabschnitten hoher Krümmung, sind sog. *Retikulons* (Membranproteine) essentiell [194]. Um die glatte Kernmembran zu generieren, müssen die Retikulons somit aus den für die Kernhülle rekrutierten Membranabschnitten entfernt werden. Dies ist ein diffusiver Vorgang. Es zeigt sich, dass dieser Vorgang in Kulturzellen auf einer Zeitskala von etwa 10 min stattfindet [194]. Dies ist von derselben Größe wie die Parameter τ .

Nach bisherigem Stand kann keine konkrete Modellierung als experimentell bestätigt angesehen werden. Die Messung der Diffusionskoeffizienten von Laminen war, wie oben dargelegt, nicht möglich. Eine anderer Ansatz wäre die Reduktion von vorhandenen Laminen via RNAi, woraufhin sich kleinere Zellkerne zeigen sollten. Ein ähnliches Vorgehen ist auch für Retikulons möglich, wobei sich die Zellkerne vergrößern sollten, wenn Retikulons einen Einfluss haben. Solche Experimente sind derzeit in Vorbereitung.

Abschließend sei noch auf die in dieser Arbeit durchgeführten RNAi-Experimente eingegangen. Bei gentechnisch vergrößerten oder verkleinerten Zellen (C27D9.1 (RNAi) bzw. ima-3 (RNAi)) wurde ein Einfluss auf die beobachteten Nukleusgrößen festgestellt. Innerhalb der dargebotenen Modellierungsansätze wird das Zellvolumen als bestimmend für die Menge der limitierenden Komponente angenommen. Zusammen mit den Ergebnissen der RNAi-Experimente legt dies den Schluss nahe, dass bei der Oogenese die Konzentration, und nicht die absolute Anzahl der konstituierenden Proteine festgelegt wird. Andernfalls sollten sich die in RNAi-behandelten Embryonen gemessenen Nukleusgrößen nicht systematisch von jenen in ungestörten Embryonen unterscheiden. Einerseits erscheint die Annahme, dass bei der Oogenese die Konzentration der Komponenten und nicht die absolute Anzahl reguliert wird, schlüssig. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass dies nicht für alle Proteinfamilien der Fall ist. Die Größe der Nukleoli kann ebenfalls, wie in Kap. 3.4.1

bereits dargelegt, durch ein *limiting component*-Modell erklärt werden. Die Größe der Nukleoli in einer Zelle (z.B. *AB*) nimmt jedoch ab, wenn diese genetisch vergrößert ist (z.B. durch C27D9.1 (RNAi)). Dies wird so interpretiert, dass hierfür die Anzahl und nicht die Konzentration der Bausteine bei der Oogenese reguliert wird [102].

3.5. Zellzyklendauern während der frühen Entwicklung

Dieses Kapitel behandelt Zellzyklendauern während der frühen Embryogenese des *C. elegans*. Nach einer kurzen Einleitung werden die sog. Zellzyklenoszillatoren eingeführt und der Stand der Forschung bezüglich Zellzyklendauern in *C. elegans*-Embryonen sowie bisher offene Fragen aufgezeigt. Daraufhin werden die Ergebnisse geschildert. Diese können durch ein im Anschluss entwickeltes Modell erklärt werden. Abschließend folgt eine Diskussion der präsentierten Ergebnisse.

Auszüge dieses Kapitels wurden 2016 in *Physical Review Letters* publiziert [195]. Ein weiterer Artikel befindet sich in Vorbereitung.

3.5.1. Einleitung

Der Wechsel zwischen den Phasen des Zellzyklus wird generell von biochemischen Oszillatoren geregelt (siehe unten). Die molekularen Komponenten dieser Oszillatoren haben sich während der gesamten Evolution der Eukaryoten erstaunlich wenig verändert, sind also hochgradig konserviert [11, 196, 197]. In der Folge sind fast alle Proteinfamilien, die bei der Steuerung des Zellzyklus in *C. elegans* eine Rolle spielen, in nur leicht veränderter Form auch in Säugern und damit auch beim Menschen vorhanden [196, 198]. Erkenntnisse, die in weniger komplexen Organismen wie etwa Hefe oder auch *C. elegans* gewonnen werden, können daher oft ohne Weiteres für komplexere Lebewesen verallgemeinert werden.

Nach intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind die molekularen Vorgänge bei der Steuerung des Zellzyklus (vor allem in nicht-blastomerischen Zellen) mittlerweile relativ gut verstanden. Eine naheliegende Fragestellung für künftige Forschung ist daher, wie die zellinternen Vorgänge in vielzelligen Systemen räumlich und zeitlich koordiniert sind, um eine erfolgreiche Entwicklung des Organismus zu gewährleisten [197]. Die Entwicklung von einer Zygote bis hin zu einem komplexen, vielzelligen Tier setzt mehrere Zellteilungsrounds voraus. Die zeitliche Abfolge der Zellteilungen ist dabei von großer Bedeutung. Es bedarf oftmals transients Zellkontakte, die eine Signaltransduktion ermöglichen. Hierfür muss sichergestellt werden, dass die Teilungszeiten der jeweiligen Zellen aufeinander abgestimmt sind. Aufgrund seiner relativ einfachen und wiederholgenauen Entwicklung stellt *C. elegans* zur Beantwortung dieser Fragen ein angemessenes Modellsystem dar.

Regulierung der Zellzyklendauer - Stand des Wissens

Enzymatische Steuerung des Zellzyklus. Der Fortgang einer Zelle durch den Zellzyklus wird generell durch komplexe biochemische Oszillatoren, die sog. Zellzyklenoszillatoren (*cell cycle oscillators*), reguliert. Dies ist auf allen Entwicklungsstufen eukaryotischen Lebens, von Hefen bis hin zu Wirbeltieren, der Fall [3, 199].

Die nun folgende Diskussion behandelt den Eintritt der Zelle in die Mitose (Übergänge zwischen anderen Phasen des Zellzyklus werden mit ähnlichen Mechanismen gesteuert). Die Mitose wird durch eine kritische Konzentration eines Proteinkomplexes, dem sog. MPF (*maturation/mitosis promoting factor*), ausgelöst. MPFs bestehen aus zwei Untereinheiten, Cyclin B und der Kinase Cdk1 (*cyclin dependent kinase*) [11]. Bei niedriger Cyclin B-Konzentration liegt Cdk1 als ungebundenes Protein vor und ist in diesem Zustand inaktiv.

Während der Interphase steigt die Cyclin B-Konzentration (z.B. infolge von Transkription) an, so dass auch die Konzentration der gebundenen Komplexe, d.h. von MPF (Cyclin B + Cdk1), ansteigt. In diesem gebundenen Zustand kann Cdk1 durch ein weiteres Protein (CAK, *Cdk activating kinase*, [11]) aktiviert werden. Aktivierte MPFs sind schließlich in der Lage, weitere Proteine zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Hierdurch wird bei Erreichen einer kritischen MPF-Konzentration letztendlich der Übergang in die Mitose ausgelöst. Der Übergang ist i.A. irreversibel, d.h., die Zelle wird bei erfolgter Auslösung in jedem Fall die Mitose durchlaufen [11, 116, 200]. Während der Mitose werden die Cycline degradiert, so dass deren Konzentration absinkt. Somit beginnt der Zellzyklus erneut. Die Cdk1-Konzentration ist typischerweise während des gesamten Zellzyklus nahezu konstant [3, 201].

Um die soeben beschriebene zeitlich-periodische Änderung der Cyclinkonzentration zu erreichen bedarf es mindestens einer negativen Rückkopplungsschleife. Eine hohe Cyclinkonzentration aktiviert in dieser Schleife einen Repressor, der die Konzentration von Cyclin negativ beeinflusst. Ein möglicher Repressor ist z.B. APC (*anaphase-promoting complex*), der von aktivem Cdk1 aktiviert wird und zum Abbau des Cyclin B führt [116, 199, 202]. Mit einer einfachen negativen Rückkopplungsschleife können allerdings auch stationäre Konzentrationen von Cyclin und dem jeweiligen Repressor auftreten. Dies kann auf mehrere Arten verhindert werden [199]: So können regulatorische Proteinspezies in die Schleife eingeführt werden, die für eine zeitlich verzögerte Wirkung des Repressors auf das Cyclin sorgen. Des Weiteren können zusätzliche positive oder doppelt-negative Rückkopplungsschleifen verwendet werden, um stationäre Konzentrationen zu vermeiden. Hier sind z.B. die Proteine Wee1 und Myt1 zu nennen [11, 199]. Als dritte Möglichkeit zur Vermeidung stationärer Cyclin-Konzentrationen sei Ultrasensitivität genannt, bei der die Aktivität bzw. die Konzentration des Repressors hochgradig nichtlinear von der des Cyclins abhängig ist. Somit wird die inhibierende Wirkung des Repressors erst bei einer kritischen Konzentration des Cyclins aktiviert, ist dann allerdings sofort in nahezu voller Stärke vorhanden [199].

Ein häufig verwendeter Mechanismus, um die oszillatorisch vorgegebenen Zyklendauern zellintern zu modulieren, ist die ratenlimitierende Transkription von Cyclinen oder weiteren relevanten Proteinen [203–205].

Neben dem zeitlichen Verlauf der MPF-Konzentration spielt auch die Lokalisierung von MPF bzw. den Untereinheiten eine Rolle [206]. Während der Interphase wechselt (ungebundenen) Cyclin B ständig zwischen Cyto- und Nukleoplasma. Bevor die Zelle jedoch in Mitose eintritt erfolgt eine Akkumulierung der MPFs im Kern [11, 207]. Dort ist aktives Cdk1/MPF unter anderem ursächlich für die Kondensation der Chromosomen während der Prophase [201], den Abbau der Kernmembran [201] sowie für den Aufbau der Kinetochore verantwortlich und steuert zudem das Einfangen der Kinetochormikrotubuli [208, 209] (vgl. Kap. 1.1.2).

C. *elegans*-spezifische Erkenntnisse zur Zellzyklendauer. Die Zellzyklen werden während der gesamten Entwicklung des *C. elegans* grundsätzlich von dem oben dargelegten Mechanismus reguliert. Wird Cdk1 in Larven ausgeschaltet, so treten keine weiteren (postembryonalen) Zellteilungen auf. Wird Cdk1 hingegen schon in der Zygote deaktiviert, unterbleibt bereits deren Teilung [197]. Die Vermutung liegt daher nahe, dass auch spätere embryonale Zellteilungen von Cdk1/MPF kontrolliert werden.

Die frühen Zellzyklen in *C. elegans* bestehen nur aus *S*- und *M*-Phase, während die *G*-Phasen übersprungen werden [12]. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch andere Modellsysteme wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der Zebrafisch *Danio rerio* und der

Krallenfrosch *Xenopus laevis* [210–212]. Die hier verwendeten Zellzyklenoszillatoren stellen eine vereinfachte Version der oben beschriebenen dar [201]. Viele der sonst verwendeten Regulationsmechanismen, z.B. zusätzliche Rückkopplungsschleifen, können hier keine Anwendung finden, da die Zellzyklendauern zu kurz sind [213]. Zudem sind die Oszillatoren vollständig von maternal zur Verfügung gestelltem Material abhängig [214]; Transkription spielt zu diesen frühen Stadien noch keine Rolle [57–59]. Insbesondere bedeutet dies, dass Cyclin wahrscheinlich nicht während der Interphase hergestellt und während der Mitose degradiert werden. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Komponenten des Zellzyklenoszillators nur zwischen ihren aktiven und inaktiven Zuständen alternieren. Es konnten zu dieser naheliegenden Vermutung jedoch keine publizierten Daten gefunden werden.

Die molekularbiologischen Unterschiede zwischen frühen Blastomeren und späteren postembryonalen Zellen sind somit nur wenig erforscht. Deutlich besser untersucht sind die absoluten Dauern der Zellzyklen während der frühen Embryogenese, sowie deren Abhängigkeit von Zelllinie und Zellschicksal (*cell fate*, d.h. die spätere Funktion der Zelle oder deren Nachkommen, hauptsächlich durch die biochemische Zusammensetzung der Zelle und Signaltransduktion bestimmt). Es ist allerdings bisher nicht abschließend geklärt, durch welchen Mechanismus die Zellzyklendauern einzelner Zellen festgelegt werden.

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Zelllinien verschiedene Entwicklungsgeschwindigkeiten aufweisen [29]. Die *AB*-Linie weist die höchste Rate auf, d.h., die Zellzyklendauern sind hier im Vergleich zu anderen Linien relativ kurz. Am langsamsten durchlaufen die Keimbahnzellen der *P*-Linie ihren Zellzyklus. Es wurde oftmals vermutet, dass die Abfolge der Zellteilungen (und damit die Zellzyklenlängen) vom Zellschicksal abhängen [215–217]. Andererseits wurde behauptet, dass die Zyklendauern zu variabel seien, um eine signifikante Konsequenz des Zellschicksals zu sein [53].

Bereits die Zellen des zweizelligen Zustandes haben unterschiedliche Zellzyklendauern. Die somatische Zelle *AB* teilt sich etwa 2 min vor ihrer Schwester P_1 . Die Gründe für diesen Unterschied liegen in der biochemischen Komposition der Zellen. Infolge der biochemisch asymmetrischen Teilung der Zygote sind die Konzentrationen von PLK-1 und Cdc-25 in *AB* gegenüber P_1 erhöht [218–220]. Die asymmetrische Aufteilung wird durch das PAR-System kontrolliert (vgl. Kap. 3.3.1). Beide genannten Proteine regulieren Cdk1 positiv, d.h., sie sind an der Aktivierung der MPF beteiligt. Effektiv wird der Zellzyklus von *AB* daher gegenüber ihrer Schwesterzelle beschleunigt. Dieser Mechanismus macht etwa 60 % des beobachteten Zeitunterschiedes von 2 min aus [213]. Ein weiterer Grund für die verspätete Teilung von P_1 ist ein Kontrollpunkt (*checkpoint*), der nur in P_1 aktiv ist, jedoch nicht in *AB*. Dies ist der sog. *DNA-replication checkpoint*, der von den ebenfalls asymmetrisch aufgeteilten Proteinen Atl-1 und Chk-1 abhängt [213]. Der Kontrollpunkt ist zwar nicht vollständig ausgebildet (P_1 teilt sich auch bei unterbundener DNA-Replikation), trägt jedoch zur verspäteten Teilung von P_1 bei. Die Autoren der Studie mutmaßen, dass der Kontrollpunkt präferentiell in der Keimbahnzelle aktiv ist, da in dieser Zelle die Stabilität des Genoms besonders wichtig ist. Immerhin entstehen aus dieser Zelle die späteren Nachkommen des Individuums [213]. Ein kompletter Screen des Genoms von *C. elegans* konnte noch mindestens 13 weitere Gene identifizieren, die einen Einfluss auf die zeitlich verzögerte Teilung von P_1 haben [122].

Bao *et al.* untersuchten die Zellzyklendauern der ersten acht (von max. zehn) Teilungsrunden während der Embryogenese [214]. Sie konnten zeigen, dass das Verhältnis der mittleren Zyklendauern zweier aufeinanderfolgender Zellgenerationen einer geometrischen Folge entspricht. Sei $\tau_{CCD,n}$ die Zellzyklendauer einer Zelle der n -ten Generation einer somatischen Zelllinie, dann gilt näherungsweise $\tau_{CCD,n+1} = \frac{1}{1-k} \cdot \tau_{CCD,n}$. Der Parameter k ist linienabhängig und liegt im Intervall (0,15–0,4). Ein Grund für dieses Verhalten

kann in der Studie nicht gegeben werden. Mit fortschreitender Entwicklung ergeben sich auch innerhalb einer Zellgeneration signifikante Unterschiede, wobei diese primär vom Schicksal der Zelle (d.h. dem *cell fate*, siehe oben) und sekundär von der individuellen Zelle abhängen. Weiterhin zeigen Embryonen leicht unterschiedliche totale Entwicklungsgeschwindigkeiten, d.h., alle Zellzyklendauern sind mit einem vom jeweils untersuchten Embryo abhängigen Faktor moduliert. Die sich daraus ergebenden Abweichungen von der mittleren Entwicklungsgeschwindigkeit haben eine relative Standardabweichung von etwa 5% [214].

Bereits in den 1980er Jahren verfolgten E. Schierenberg *et al.* die Zellteilungszeiten während der frühen Embryogenese unter verschiedenen Bedingungen [41, 221, 222]. Gemäß ihrer Beobachtungen ist für eine erfolgreiche Entwicklung vor allem die relative Abfolge der Zellteilungen wichtig, während die generelle Entwicklungsgeschwindigkeit nachrangig ist. Wird die Cytokinese der Zygote unterbunden, so liegt eine Zelle mit immer mehr Zellkernen vor (Mitose findet weiterhin statt). Deren Zyklendauern sind im Vergleich zu ungestörten Embryonen synchronisiert und entsprechen etwa dem über alle Zelllinien gemittelten Wert in ungestörten Embryonen. Zudem zeigt eine Zygote, deren Zellkern entfernt wurde, weiterhin periodische Cytokinese-artige Abrundungen und Kontraktionen, wobei die Periodendauer etwa der erwarteten Zellzyklendauer entspricht. Wird einer Zelle in Interphase etwas Cytoplasma entfernt, so verlängern sich die Zellzyklendauern ihrer Töchter geringfügig. Wird hingegen einer Zelle Cytoplasma einer Zelle der gleichen Linie hinzugefügt, so tritt der gegenteilige Effekt ein, d.h., die Zyklendauern ihrer Töchter verkürzen sich geringfügig. Des Weiteren hat die DNA-Menge einen leichten Einfluss auf die Zyklendauern. Haploide Embryonen entwickeln sich schneller als ungestörte, tetraploide hingegen verlangsamt. Schließlich wurde noch Zellen Cytoplasma einer linienfremden Zelle hinzugefügt. Dabei zeigt sich, dass Cytoplasma der Keimbahn, das somatischen Zellen angeheftet wird, diese verlangsamt. Somatisches Cytoplasma, das einer Keimbahnzelle hinzugefügt wird, beschleunigt deren Zellzyklen [41].

Die bislang einzige Studie, bei welcher der Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der Zellzyklendauer untersucht wurde, stammt von Arata *et al.* [107] (über dortige Probleme der Zellvolumenbestimmung siehe Kap. 2.2.2). Die Autoren untersuchten die frühe Entwicklung bis hin zur siebten Generation der *AB*-Linie, wobei jeweils die Zellzyklendauer und das Zellvolumen bestimmt wurde. Die Autoren beschreiben den Zusammenhang zwischen Zyklendauer und Zellvolumen mittels Potenzgesetzen der Art $y = a \cdot x^b$ (freie Parameter a , b). Es zeigt sich eine Aufteilung in drei Gruppen: die Linien *AB* und *MS* weisen mittlere Exponenten b von etwa 0,3 auf; die Linien *C* und *P* zeigen größere Exponenten im Bereich 0,4; die *D*- und *E*-Linien hingegen weisen nur eine geringe Abhängigkeit von der Zellgröße auf ($b < 0,15$). Eine konsistente, zelllinienübergreifende Erklärung für das unterstellte Auftreten eines Potenzgesetzes kann in der Studie nicht gegeben werden [107].

Bei einer Studie von Begasse *et al.* über die Temperaturabhängigkeit der Entwicklung konnte gezeigt werden, dass die Zyklendauer der Zygote P_0 (definiert als die Zeit zwischen *pronuclear meeting* und Einsetzen der Cytokinese) einer Arrhenius-Skalierung folgt, d.h., exponentiell von der Umgebungstemperatur abhängt [114]. Ab etwa 25°C ergeben sich Abweichungen, wobei die Zyklendauer bei einer Temperaturerhöhung nicht mehr so stark wie vorhergesagt abnimmt. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass hier das Ende des fortpflanzungsfähigen Temperaturbereiches erreicht ist.

C. *elegans*-spezifische Erkenntnisse zur Dauer der M-Phase. Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass die Dauern einiger Teilphasen der *M*-Phase nicht von der Zellgröße abhängen und somit für alle Zellen etwa gleich lang sind. Dies gilt für die Cytokinese, worauf

bereits in Kap. 1.1.2 hingewiesen wurde [21]. Die Unabhängigkeit der Cytokinesedauer von der Zellgröße kann letztlich auf die Dynamik des Aktomyosinkortex zurückgeführt werden [223]. Weiterhin konnten Hara *et al.* zeigen, dass die Geschwindigkeit der Chromosomenkondensation nicht von der Zellgröße abhängt, und damit insbesondere auch von der Nukleusgröße unabhängig ist (vgl. Kap. 3.4) [104]. In der oben zitierten Studie von Arata *et al.* wird die Dauer der Mitose insgesamt als unabhängig von der Zellgröße angegeben. Auch eine signifikante Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie zeigt sich nicht [107]. Jedoch spezifizieren die Autoren nicht, wie die Daten gewonnen wurden, d.h., die Kriterien zur Klassifikation des Beginns und des Endes der Mitose sind nicht angegeben. Es ist damit nicht klar, welches Intervall von den publizierten Daten umfasst ist. Ein ungeprüftes Vertrauen in diese Daten empfiehlt sich somit nicht.

Offene Fragen

In der vorangegangenen Zusammenfassung bisheriger Erkenntnisse wurde bereits deutlich, dass die Festsetzung der Zellzyklendauern in *C. elegans*-Embryonen bisher keineswegs vollständig verstanden ist. Offene Fragen, die in diesem Kapitel behandelt werden, sind daher:

- Wie hängt die Dauer der *M*-Phase von Zellvolumen und Zelllinie ab?
- Wie hängen die gesamten Zellzyklendauern von Zellvolumen und Zelllinie ab?
- Beeinflusst das Zellvolumen die Zellzyklendauer kausal?
- Gilt die von Begasse *et al.* in [114] beobachtete Temperaturabhängigkeit für alle Zellen und Teilphasen des Zellzyklus?
- Kann mit allen hier gewonnen und sonstigen Ergebnissen ein konsistentes Modell erstellt werden, welches die Festlegung der Zellzyklendauern erklärt?

3.5.2. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die gewonnenen Ergebnisse bezüglich Zellzyklendauern in *C. elegans*-Embryonen vorgestellt. Das Kapitel ist dabei wie folgt untergliedert: Zuerst wird gezeigt, dass die Dauer der Mitose vom Zellvolumen unabhängig, aber für Keimbahnzellen verlängert ist. Danach werden die gesamten Zellzyklendauern untersucht. Hier ergibt sich eine Antikorrelation zwischen Zellvolumen und Interphasendauer. Anschließend kann gezeigt werden, dass das Zellvolumen die Dauer der Interphase kausal beeinflusst. Temperaturabhängige Messungen ergeben, dass alle Teilphasen der Zellzyklen exponentiell mit der Temperatur skalieren, allerdings unterschiedlich stark. Schließlich wird anhand der Ergebnisse ein Modell entwickelt, mit dem die Antikorrelation zwischen Zellvolumen und Interphasendauer rationalisiert werden kann.

Die Dauer der Mitose hängt nicht vom Zellvolumen ab

In der Einleitung dieses Kapitels wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Dauer einiger Teilphasen der *M*-Phase nicht vom Zellvolumen abhängt. Dies wurde bisher für die Cytokinese [21] und die Kondensation der Mitosechromosomen während der Prophase gezeigt [104]. Die Dauer dieser Prozesse ist somit für alle Zellen ungefähr gleich. Eine Abhängigkeit von der Zelllinie ist anhand der publizierten Daten nicht erkennbar [21, 104]. Es ist hingegen nicht abschließend bekannt, ob die gesamte Mitosedauer ebenfalls unabhängig

von der Zellgröße ist, und ob sie von der Zelllinie abhängt (die Ergebnisse in [107] wurden aufgrund von methodischen Problemen verworfen, siehe Einleitung, Kap. 3.5.1).

An dieser Stelle sollen daher entsprechende Messungen Auskunft über die aufgezeigten Fragen geben. Dies geschieht anhand von Aufnahmen der Linie XA3501, da diese zusätzlich für verschiedene Umgebungstemperaturen vorliegen. Somit kann zugleich die Temperaturabhängigkeit der Mitosedauer untersucht werden, was sich für spätere Ergebnisse dieses Kapitels als vorteilhaft erweist. Der Eintritt in die Mitose ist durch den Übergang aus der Interphase in die Prophase gekennzeichnet, in der die Chromosomen zu kondensieren beginnen (vgl. Kap. 1.1.2). Da in Aufnahmen der Linie XA3501 die Plasmamembran nicht fluoreszenzmarkiert ist, ist das Ende der Cytokinese nicht ablesbar¹. Aus diesem Grund wird der Eintritt in die Anaphase bei der Teilung der Metaphasen-Platte als scharf bestimmbares Maß für das Ende der Mitose gewertet. Die gemessene Dauer τ_{P-A} beinhaltet somit die Pro-, Prometa- und Metaphase, wohingegen die Dauern der Ana- und Telophase fehlen.

Die Auswertung erfolgt vollständig manuell. Die Entwicklung eines Embryos wird Bildstapel für Bildstapel verfolgt (vgl. Abb. 3.22a). Sobald die Intensitätsverteilung innerhalb des aktuell untersuchten Zellkerns signifikante Inhomogenität aufweist, wird dies als beginnende Kondensation der Chromosomen und somit Eintritt in die Prophase gewertet (vgl. Abb. 3.22a, zweites Bild v.l.). Der entsprechende Zeitpunkt t_P markiert folglich den Beginn der Mitose. Das Ende des ausgewerteten Zeitraumes, t_A , ist erreicht, sobald die Metaphasen-Platte in zwei Chromatinanordnungen zerfällt und die Anaphase beginnt (vgl. Abb. 3.22a, letztes Bild). Mit diesen beiden bestimmten Zeitpunkten ergibt sich $\tau_{P-A} = t_A - t_P$. Die maximal erreichbare Ablesegenauigkeit entspricht dem zeitlichen Abstand zweier Bildstapel, $\Delta t = 30$ s.

Während der Eintritt in die Anaphase über einen objektiv bestimmbareren Zeitpunkt definiert ist, ist die Bestimmung des Beginns der Prophase zwangsläufig subjektiv. Dies liegt daran, dass das Bild eines Zellkerns immer zu einem gewissen Grad inhomogen ist und somit keine scharfe Trennung zwischen Inter- und Prophase möglich ist. Um die daraus resultierenden Fehler möglichst klein zu halten, wurde bei der Auswertung darauf geachtet, immer zuerst den Beginn der Prophase auszulesen und erst danach den Beginn der Anaphase. Hierdurch kann die Bestimmung nicht durch eine Erwartung beeinflusst werden, wodurch ein Bestätigungsfehler (*confirmation bias*) ausgeschlossen wird. Weiterhin hängt die Güte dieses Vorgehens stark von der Bildqualität ab. In unscharf abgebildeten oder kleinen Zellkernen ist ein stabiles Auslesen des Beginns der Prophase nicht möglich. Da die Bildqualität in tieferen Schichten des Embryos stark abnimmt, wurde auf eine Auswertung in diesen Regionen verzichtet, d.h., es wurden nur Nuklei an der dem Detektionsobjektiv zugewandten Seite des Embryos untersucht.

Insgesamt konnten mit dem beschriebenen Verfahren τ_{P-A} für die ersten vier Zellgenerationen der *AB*-Linie, *EMS*, *MS* sowie P_1 bis P_3 bestimmt werden. Je untersuchtem Embryo wurde dabei für jede Generation der *AB*-Linie eine repräsentative Zelle an der Oberfläche des Embryos (siehe oben) ausgewählt und analysiert. Da sich die Zelle *C* in der Mehrheit der aufgenommenen Embryonen an der dem Detektionsobjektiv abgewandten Seite des Embryos befand, wurde auf eine Auswertung dieser Zelle verzichtet. Die Zelle *E* tritt generell etwa eine Minute nach *MS* in die Mitose ein. Auch die Anaphase von *E* beginnt etwa eine Minute nach der von *MS*, so dass sich die Dauern τ_{P-A} für beide Zellen

¹Dies ist auch bei vorhandener Membranmarkierung nur schwer möglich, da das finale Schließen des kontraktiven Ringes am Ende der Cytokinese bei der gegebenen Auflösung kaum verlässlich beobachtet werden kann.

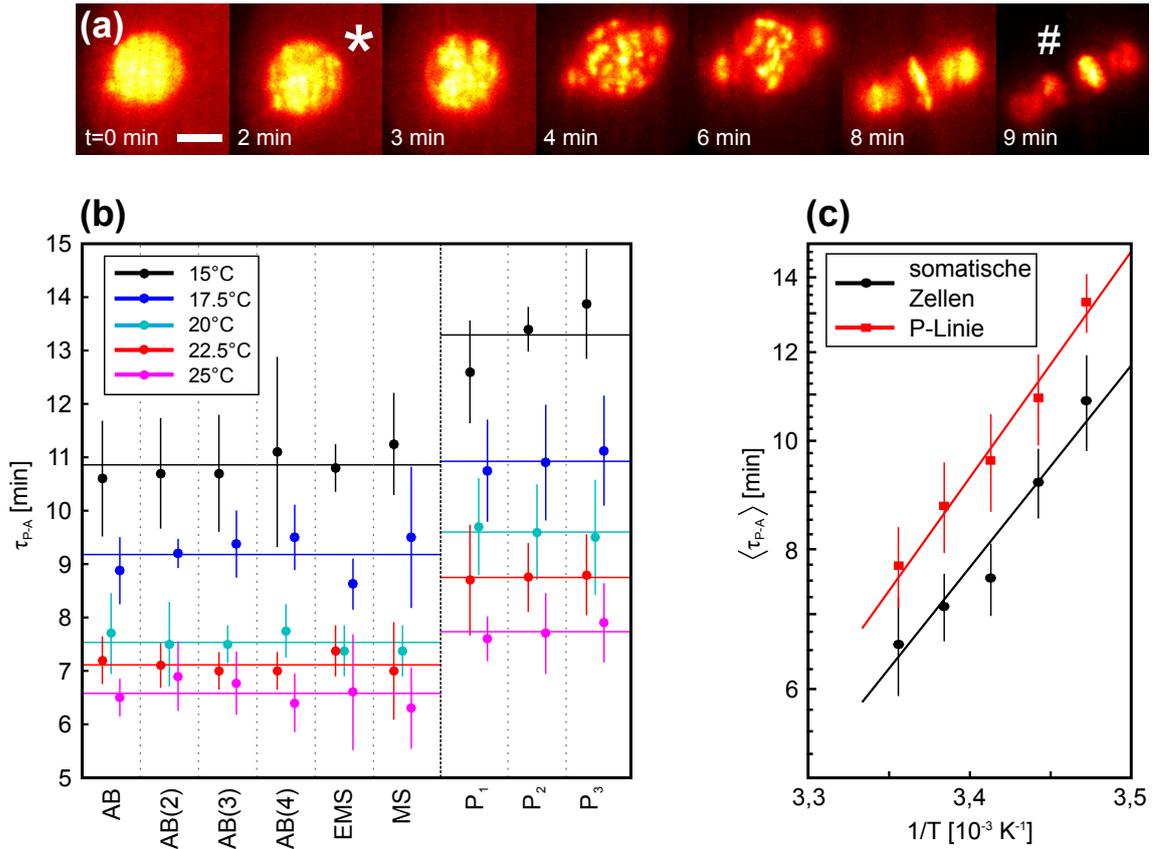


Abbildung 3.22.: Volumen- und Temperaturabhängigkeit der Zeitspanne zwischen Pro- und Anaphase. (a) Die Bestimmung der Dauer τ_{P-A} (Zeitspanne zwischen Beginn der Pro- und Anaphase) erfolgt manuell anhand der Bilder von Embryonen der Linie XA3501. Der Eintritt in die Prophase ist durch steigende Inhomogenität der Intensitätsverteilung im Zellkern markiert (*). Die Anaphase setzt ein, wenn die Metaphasen-Platte in zwei Chromatinanordnungen zerfällt (#). Die erreichbare Zeitaufösung entspricht dem zeitlichen Abstand zweier Aufnahmen, $\Delta t = 30$ s. Der gezeigte Zellkern gehört zur Zelle P_1 , die Aufnahme fand bei 25°C statt. Längenskala $5\ \mu\text{m}$. (b) Die Bestimmung von τ_{P-A} wurde bei fünf Umgebungstemperaturen T (15°C , $17,5^\circ\text{C}$, 20°C , $22,5^\circ\text{C}$ und 25°C) für die ersten vier Zellgenerationen der AB -Linie, EMS , MS und P_1 bis P_3 in jeweils $n = 5$ Embryonen durchgeführt. Die abgebildeten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Wie sich zeigt, unterscheiden sich die τ_{P-A} für alle somatischen Zellen bei einer festen Umgebungstemperatur nicht signifikant, sind also insbesondere vom Zellvolumen unabhängig. Dies gilt ebenso für die Zellen der Keimbahn, allerdings sind dort die τ_{P-A} gegenüber den somatischen Zellen erhöht. Waagerechte Linien entsprechen den Ensemblemittelwerten somatischer bzw. Keimbahnzellen. (c) Die mittleren τ_{P-A} für somatische bzw. Keimbahnzellen (Mittelwerte + mittlere Standardabweichungen) folgen einer inversen Arrhenius-Skalierung $\tau_{P-A} \propto e^{T_0/T}$ mit $T_{0,\text{somatisch}} = 4586\ \text{K}$ und $T_{0,\text{Keimbahn}} = 4344\ \text{K}$. Details siehe Text.

innerhalb der erreichbaren Genauigkeit nicht unterscheiden. Auf eine explizite Auswertung von E wurde daher ebenso verzichtet.

Das beschriebene Vorgehen wurde für alle genannten Zellen in jeweils $n = 5$ Embryonen bei insgesamt fünf Umgebungstemperaturen durchgeführt. Diese waren 15°C , $17,5^\circ\text{C}$, 20°C , $22,5^\circ\text{C}$ sowie 25°C .

Die damit erhaltenen Werte werden für jede untersuchte Zelle über alle Embryonen gemittelt. Die Ergebnisse (Mittelwerte + Standardabweichungen) sind in Abb. 3.22b gezeigt. Wie man erkennt, zeigt τ_{P-A} weder für somatische noch für Keimbahnzellen eine systematische Abhängigkeit von der Zellgröße (AB und $AB(4)$ bzw. P_1 und P_3 unterscheiden sich um fast eine Größenordnung im Volumen, vgl. Kap. 3.2.1). Weiterhin kann zwischen den somatischen Zellen der AB -Linie, EMS und MS kein Unterschied festgestellt werden.

Jedoch zeigen die Keimbahnzellen P_1 bis P_3 signifikant erhöhte Werte τ_{P-A} gegenüber jenen der somatischen Zellen. Ein möglicher Grund für diese Erhöhung liegt im Vorhandensein des *DNA-replication checkpoint* in den Keimbahnzellen, welcher in somatischen Zellen fehlt (experimentell gezeigt für AB und P_1 , vgl. Kap. 3.5.1) [213].

Des Weiteren wird ein starker Einfluss der Temperatur auf τ_{P-A} deutlich. Je höher die Temperatur ist, desto kleiner wird die benötigte Zeit τ_{P-A} . Die mittleren Dauern $\langle\tau_{P-A}\rangle$ für somatische und Keimbahnzellen (gemittelt über AB bis $AB(4)$, EMS und MS bzw. P_1 bis P_3) sind in Abb. 3.22c in einem Arrheniusgraph gegen die Temperatur aufgetragen. $\langle\tau_{P-A}\rangle$ folgt in guter Näherung einer inversen Arrhenius-Skalierung, d.h. $\langle\tau_{P-A}\rangle \propto e^{T_0/T}$. Die Inversion erklärt sich durch die Tatsache, dass eine Arrhenius-Skalierung typischerweise die Temperaturabhängigkeit einer Rate beschreibt und τ_{P-A} im Grunde eine inverse Rate darstellt. Die relevanten Skalierungsparameter nehmen die Werte $T_{0,somatisch} = 4586$ K und $T_{0,Keimbahn} = 4344$ K an. Sowohl somatische als auch Keimbahnzellen zeigen somit dieselbe exponentielle Temperaturabhängigkeit. Dies deutet darauf hin, dass die gemessenen Dauern hauptsächlich durch biochemische Prozesse determiniert sind.

In Kap. 3.1.1 wurde der sog. Q_{10} -Wert eingeführt. Dieser Faktor gibt die Zunahme einer Prozessgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10°C an und liegt für typische biologische/biochemische Prozesse bei (2-3) [117]. Für die hier untersuchte Dauer τ_{P-A} ergibt sich $Q_{10} = \frac{1/\tau_{P-A}(25^\circ\text{C})}{1/\tau_{P-A}(15^\circ\text{C})} \approx 1,8$. Der Wert ist folglich etwas niedriger als bei anderen Prozessen (entsprechend einer geringeren Temperaturabhängigkeit), liegt aber dennoch grob im erwartbaren Bereich.

Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass die Dauer τ_{P-A} von der Zellgröße unabhängig ist. Die Vermutung liegt somit nahe, dass dies auch für die gesamte Mitosedauer gilt. Zusammen mit der bereits bekannten Tatsache, dass auch die Dauer der Cytokinese nicht von der Zellgröße abhängt, gilt dies somit auch für die Gesamtdauer der M -Phase. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Keimbahnzellen eine signifikant erhöhte Dauer τ_{P-A} gegenüber somatischen Zellen aufweisen. Drittens zeigen die τ_{P-A} eine Arrhenius-Skalierung.

Zellzyklendauer und Zellvolumen sind antikorreliert

Nachdem die Dauer der Mitose untersucht wurde, soll an dieser Stelle die Skalierung der gesamten Zellzyklendauern, τ_{CCD} , mit dem Zellvolumen untersucht werden. Bereits in Kap. 3.4.2 wurde deutlich, dass die Dauer der Interphase invers mit dem Zellvolumen skaliert (vgl. Abb. 3.17).

Zur Untersuchung des Zusammenhangs werden Daten von ungestörten Embryonen der Linie OD95 bei $22,5^\circ\text{C}$ verwendet. Bei Aufnahmen der Linie OD95 können durch die Doppelmarkierung, anders als bei solchen der Linien OD58 und XA3501, für jeden Embryo sowohl Zellvolumen als auch die zugehörigen Zellzyklendauern bestimmt werden. Auf die Bestimmung der Zellvolumen wurde bereits in Kap. 3.2.1 detailliert eingegangen.

Die Zellzyklendauern τ_{CCD} werden hier als die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Anaphase in der Mutterzelle und dem darauffolgenden Eintritt in die nächste Anaphase definiert. Die jeweiligen Zeitpunkte entsprechen jenen, bei denen beim Tracking der Zellkerne eine Zelle als geteilt angesehen wird. Insofern hat die Definition von τ_{CCD} den Vorteil, dass die Zellzyklendauern direkt aus dem Trackingergebnis auslesbar sind (vgl. Kap. 2.2.1). Eine andere mögliche Definition von τ_{CCD} wäre z.B. die Zeitspanne zwischen zwei erfolgten Cytokinesen. Aufgrund der Resultate des vorherigen Unterkapitels (konstante Dauer der M -Phase) kann allerdings angenommen werden, dass dies zu den selben Ergebnissen führen würde.

Insgesamt wurden $n = 10$ ungestörte Embryonen ausgewertet. Das Tracking sowie die Volumenbestimmung erfolgte generell von der Zygote P_0 bis zum Erreichen des 44-zelligen Zustandes. Somit sind die τ_{CCD} aller postzygotischen Zellen, die sich vor dem Erreichen des 44-zelligen Zustandes bereits geteilt haben, direkt aus dem Tracking auslesbar. Konkret trifft dies auf die ersten fünf Generationen der AB -Linie, EMS , die jeweils ersten beiden Generationen der MS - und C -Linie, E sowie P_1 bis P_3 zu. Die Zellzyklendauern für alle Zellen der dritten Generation der MS - und C -Linie (insgesamt acht Zellen) sowie für D und P_4 wurden für jeden untersuchten Embryo zusätzlich manuell aus den Aufnahmen bestimmt. Die an dieser Stelle auswertbaren Daten umfassen damit die ersten fünf Generationen der AB -Linie, vier Generationen der MS -Linie (hier wurde EMS als erste Generation hinzu gezählt), drei Generationen der C -Linie und die gesamte postzygotische Keimbahn (P_1 bis P_4). Dass die Zelle EMS der MS -Linie hinzugefügt wird, wird durch die Tatsache gerechtfertigt, dass sich EMS quantitativ genauso wie alle späteren MS -Zellen verhält (siehe unten).

Auf eine Auswertung der E - und D -Linie wird verzichtet. Die Zelle D ist die einzige dieser Linie, für die sowohl das Volumen, als auch τ_{CCD} bekannt ist (die Zelllinie D wird als letztes durch die Teilung einer P -Zelle erzeugt und entsteht somit erst kurz vor dem Ende des beobachteten Zeitraumes). Für diese Zelllinie ist daher nur ein einziger Datenpunkt vorhanden, weshalb eine Analyse sinnlos ist. Für die E -Linie wären prinzipiell zwei Zellgenerationen (E und ihre Tochterzellen) in den Aufnahmen zugänglich. Jedoch sind Ea und Ep die ersten beiden Zellen, die über eine G -Phase verfügen [12, 13]. Sie verhalten sich daher qualitativ anders als alle anderen frühen Blastomere. Aus diesem Grund wird auch die E -Linie nicht weiter betrachtet.

Alle untersuchten Zellen haben gemein, dass sie erstens nur zwischen S - und M -Phase oszillieren und G -Phasen übersprungen werden (vgl. Kap. 1.1.2). Somit gilt

$$\tau_{CCD} = \tau_s + \tau_m, \quad (3.21)$$

mit der Dauer der Inter- bzw. S -Phase τ_s und der Dauer der M -Phase τ_m . Außerdem werden alle Zellen *vor* dem Eintritt des Embryos in die Gastrulation durch Zellteilung erzeugt. Es wird an dieser Stelle erneut darauf hingewiesen, dass der Beginn der Gastrulation der Zeitpunkt ist, an dem bei abgeschalteter Transkription erste Abweichungen auftreten [57–59].

Die Zellzyklendauern τ_{CCD} sowie die Zellvolumina V_{zelle} wurden für alle zehn untersuchten Embryonen separat bestimmt. Um natürliche Schwankungen in der Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen [214] sowie Messfehler zu unterdrücken, werden im Folgenden prinzipiell über alle Embryonen gemittelte Werte τ_{CCD} und V_{zelle} verwendet. Die Ergebnisse für alle untersuchten Linien sind in Abb. 3.23 dargestellt. Für die Linien AB , MS und C sind dort zusätzlich die “Generationsmittel” eingetragen, d.h. die mittleren Zellvolumen und Zellzyklendauern aller Zellen einer Generation (innerhalb einer Linie). Da jede Generation der Keimbahn aus genau einer Zelle besteht, ist hier ein Generationsmittel überflüssig.

Man erkennt eine deutliche Antikorrelation der Zellzyklendauern mit den Zellvolumina, d.h., kleinere Zellen brauchen länger, bevor sie erneut in Mitose eintreten. Zudem zeigt sich bei großen Zellvolumina ein Abflachen des Zusammenhangs. Weiterhin ergibt sich eine signifikante Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zu einer Zelllinie, im Einklang mit vorherigen Beobachtungen [29]. So ist die Abhängigkeit der Zellzyklendauer vom Zellvolumen für die AB -Linie am schwächsten ausgeprägt und für die MS - sowie die C -Linie etwas größer. Am stärksten zeigt sie sich für Keimbahnzellen.

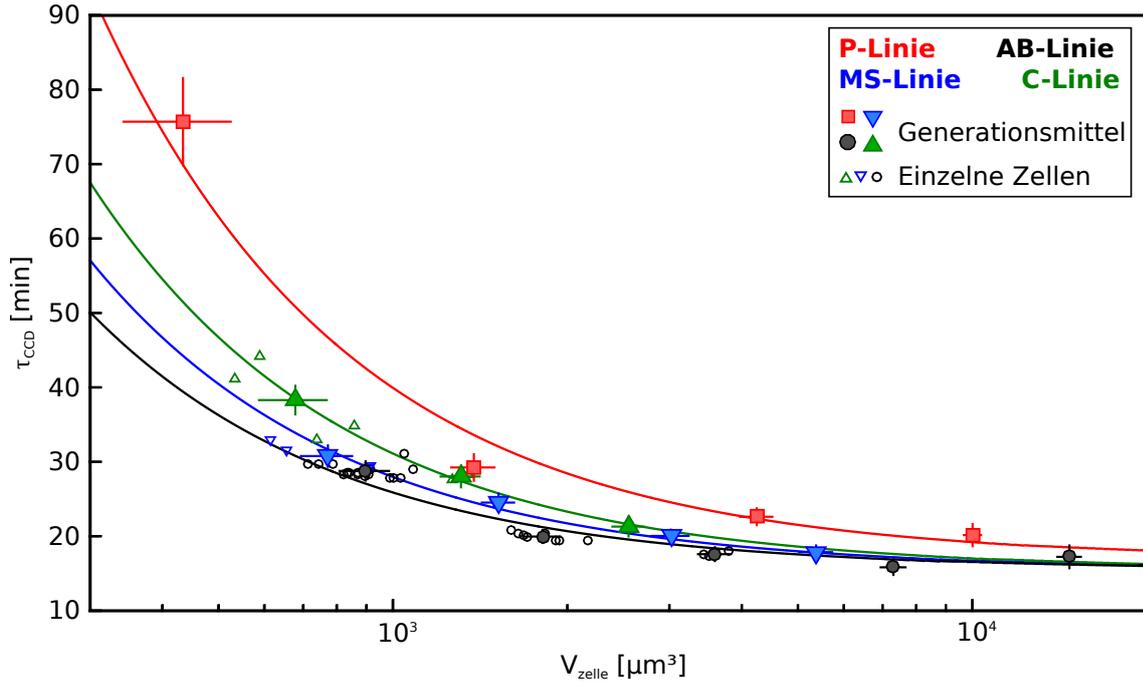


Abbildung 3.23.: Zusammenhang zwischen Zellvolumina und Zellzyklendauern. Die Zellzyklendauern τ_{CCD} sind gegen die Zellvolumina V_{zelle} für die vier untersuchten Zelllinien aufgetragen (rot: *P*-Linie/Keimbahn, schwarz: *AB*-Linie, blau: *MS*-Linie (mit *EMS*), grün: *C*-Linie). Für die somatischen Zelllinien sind neben den Daten einzelner Zellen (offene kleine Symbole) auch die Generationsmittel, d.h. die Mittelwerte aller Zellen einer Zellgeneration innerhalb einer Zelllinie, eingetragen (geschlossene große Symbole). Die Werte sind Mittelwerte aller untersuchten Embryonen ($n = 10$ ungestörte Embryonen, Linie OD95, 22,5 °C), Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. Zusätzlich sind Fitkurven gemäß Gl. 3.22 eingetragen. Für alle somatischen Linien wurde dabei τ_M auf einen gemeinsamen Wert festgesetzt (Begründung & Vorgehen siehe Text).

Wie sich zeigt, können die τ_{CCD} durch einen einfachen funktionalen Zusammenhang mit V_{zelle} hinreichend gut beschrieben werden. Die in Abb. 3.23 mit eingezeichneten Fitfunktionen sind von der Gestalt

$$\tau_{CCD,f} = \frac{\alpha}{V_{zelle}} + \tau_M. \quad (3.22)$$

Hier ist V_{zelle} das Zellvolumen, α und τ_M dienen als Fitparameter. Während α zwischen V_{zelle} und τ_{CCD} vermittelt, ist τ_M ein vom Zellvolumen unabhängiger Bestandteil der Zellzyklendauer. Ein Vergleich von Gl. 3.22 mit Gl. 3.21 legt nahe, dass der Term α/V_{zelle} die Dauer der Interphase τ_s beschreibt. Aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Unterkapitels wird τ_M (zumindest größtenteils) mit der Dauer der *M*-Phase τ_m identifiziert. Es ist jedoch auch möglich, dass ein Abschnitt der Interphase eine von der Zellgröße unabhängige Zeitspanne benötigt und somit zu τ_M gezählt werden muss.

Aufgrund des linienspezifischen Verhaltens von τ_{P-A} werden die Fitparameter in Gl. 3.22 nicht für alle Zelllinien unabhängig angepasst. Vielmehr werden alle somatischen Linien so gefittet, dass sich für sie derselbe Wert τ_M ergibt. α wird für alle Linien als freier Parameter verwendet. Im Gegensatz dazu sind bei den Daten der Keimbahn beide Parameter frei. Das Vorgehen zur Kurvenanpassung bei den drei somatischen Zelllinien *AB*, *MS* und *C* ist daher wie folgt: Mit einem festen τ_M werden die Daten der *AB*-, *MS*- und *C*-Linie gefittet, d.h., α als jeweils einziger freier Parameter angepasst. Das vorgegebene τ_M wird in Schritten von 0,05 min variiert und obiges Vorgehen wiederholt. Derjenige Wert von τ_M , bei dem die sich ergebenden kumulierten quadratischen Abweichungen zwischen Fit und

Zelllinie	α [$\mu\text{m}^3 \cdot \text{min}$]	τ_M [min]
<i>P</i> -Linie (Keimbahn)	23 025	16,94
<i>AB</i> -Linie (somatisch)	10 326	} 15,55
<i>MS</i> -Linie (somatisch)	12 423	
<i>C</i> -Linie (somatisch)	15 582	

Tabelle 3.1.: Zelllinienabhängige Fitparameter der Gl. 3.22. Die Werte korrespondieren mit den in Abb. 3.23 eingezeichneten Kurven. Zum Vorgehen bei der Kurvenanpassung siehe Text.

Datenpunkten minimal werden, wird als optimal klassifiziert. Abschließend werden die zugehörigen α -Werte bestimmt. Alle Fits werden logarithmisch durchgeführt. Des Weiteren werden zum Fitten die Generationsmittel verwendet. Würden stattdessen die Daten einzelner Zellen verwendet, so hätten spätere Zellgenerationen ein exponentiell höheres Gewicht (die fünfte Generation der *AB*-Linie besteht aus 16 Zellen, die erste aus einer einzigen).

Die mit dem beschriebenen Verfahren erhaltenen Kurven (vgl. Abb. 3.23) zeigen mit dem groben Verlauf der experimentell gewonnenen Daten eine gute Übereinstimmung. Eine signifikante Abweichung hin zu kleineren Zellzyklendauern als durch die Fits vorhergesagt zeigt sich lediglich bei der Zelle P_3 . Für *AB* zeigt sich eine systematische Abweichung hin zu größeren Zeiten. Tatsächlich weist *AB* in der Mehrheit der untersuchten Embryonen sogar eine längere Zellzyklendauer als ihre nur etwa halb so großen Tochterzellen auf. Allerdings sind die Zellvolumen von *AB* und ihren Töchtern noch so groß, dass $\alpha/V_{zelle} \ll \tau_M$ gilt, d.h., die Abweichung ist wahrscheinlich nicht auf einen volumenabhängigen Effekt zurückzuführen. Eine Möglichkeit besteht in einem durch Signaltransduktion induzierten Programm (z.B. einem Kontrollpunkt o.ä.), welches in *AB* abläuft, in ihren Tochterzellen jedoch nicht.

Die durch das oben geschilderte Vorgehen erhaltenen Fitparameter für α und τ_M sind für alle untersuchten Zelllinien in Tabelle 3.1 gesammelt. Nun können die bereits vorher geschilderten qualitativen Beobachtungen quantifiziert werden. Die Keimbahn weist eine deutlich stärkere Abhängigkeit vom Zellvolumen auf als die somatischen Zelllinien, d.h., α ist für die Keimbahn um einen Faktor (1,5-2,5) gegenüber somatischen Linien erhöht. Außerdem ist α für die somatischen Linien umso kleiner, je früher sie durch die Teilung einer *P*-Zelle erzeugt werden (die *AB*-Linie entsteht im zweizelligen, die *MS*-Linie im vierzelligen und die *C*-Linie im achtzelligen Zustand, vgl. Abb. 1.5a). Die entsprechenden Werte von α nehmen dabei um jeweils etwa 20% zu. Des Weiteren ergibt sich für die Keimbahn ein τ_M , welches gegenüber den somatischen Linien um etwa 1,4 min erhöht ist. Der Unterschied zwischen den τ_{P-A} der Keimbahn und somatischen Linien bei 22,5 °C (vgl. oben) beträgt 1,64 min. Beide Werte zeigen eine gute Übereinstimmung. Zu beachten ist hierbei, dass die Bestimmung von τ_M und τ_{P-A} voneinander vollständig unabhängig ist. Dieses Ergebnis stützt die Interpretation, dass τ_M hauptsächlich die Dauer der *M*-Phase beschreibt.

Insgesamt kann somit festgehalten werden, dass die frühen Zellzyklendauern τ_{CCD} aus zwei Abschnitten bestehen. Der volumenunabhängige Teil von τ_{CCD} ist größtenteils identisch mit der Dauer der *M*-Phase, während der zum Zellvolumen indirekt proportionale Teil hauptsächlich die Interphase beschreibt. Zusammengefasst können die Zellzyklendauern somit durch Gl. 3.22 beschrieben werden. Es gibt folglich eine klare Antikorrelation zwischen Zellvolumen und Zellzyklendauer. Eine Kausalität (V_{zelle} beeinflusst τ_{CCD}) ist damit jedoch nicht zwingend. Dies wird im nächsten Unterkapitel getestet.

Zellzyklendauern hängen kausal von Zellvolumina ab

Der Test, ob das Zellvolumen die Zellzyklendauer kausal beeinflusst, ist durch eine Änderung des Zellvolumens relativ einfach möglich. Vergrößerte Zellen sollten - bei einem tatsächlich kausalen Zusammenhang - nach Gl. 3.22 eine kürzere Zellzyklendauer aufweisen und umgekehrt.

Eine Veränderung der Zell-/Embryonalvolumina ist mittels RNAi möglich (vgl. Kap. 2.1 und Kap. 3.2.2). Ein Ausschalten des Gens C27D9.1 via RNAi führt zu Embryonen, die im Vergleich zu ungestörten Embryonen ein um etwa 15 % größeres Gesamtvolumen aufweisen. Wird hingegen das Gen *ima-3* ausgeschaltet, nimmt das embryonale Gesamtvolumen um circa 30 % ab (Kap. 3.2.2). Als zusätzliche Kontrollgruppe werden hier Embryonen ohne starre Chitinhülle herangezogen. Wie in Kap. 3.2.2 gezeigt wurde, ändert sich in dieser Gruppe das embryonale Gesamtvolumen nicht signifikant. Der Einfluss auf die einzelnen Zellvolumina wurde in Kap. 3.3 untersucht.

Alle in diesem Unterkapitel verwendeten Daten stammen von Aufnahmen der Linie OD95 bei 22,5 °C. Die Auswertung erfolgt dabei auf drei Ebenen. Zuerst wird die Entwicklungsgeschwindigkeit auf der Ebene des gesamten Organismus untersucht. Danach wird der Einfluss der unterschiedlichen Konditionen auf einzelne Zellgenerationen und schließlich auf einzelne Zellen (innerhalb einer Zellgeneration) betrachtet.

Entwicklungsgeschwindigkeit auf Organismenebene. Zuerst soll die Entwicklungsgeschwindigkeit des gesamten Embryos anhand eines einzigen Wertes charakterisiert werden. Für den Fall, dass die Zellvolumina die Zellzyklendauern kausal bestimmen, sollten größere Embryonen eine schnellere Entwicklung aufweisen, während sich kleinere Embryonen langsamer entwickeln.

Zu diesem Zweck wird die Zellverdopplungsdauer eingeführt. Diese gibt die Zeitspanne an, nach welcher sich die Zellanzahl im Embryo im Mittel verdoppelt hat. Hierfür wird aus dem Tracking die Zellanzahl N als Funktion der Zeit bestimmt, $N = N(t)$. Der Zeitnullpunkt wird auf den Eintritt in den vierzelligen Zustand festgelegt, Daten vor diesem Zustand werden verworfen. Wie bereits an anderer Stelle (Kap. 3.1.1), wird jedes Tracking bis zum Ende des 24-zelligen Zustandes ausgewertet. Mittels dieser Daten kann die mittlere Zellanzahl $\langle N \rangle(t)$ als Funktion der Zeit für jede der vier untersuchten Konditionen gemäß $\langle N \rangle(t) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n N(t)$ berechnet werden. Dabei ist n die Anzahl der jeweils ausgewerteten Embryonen: $n = 10$ ungestörte Embryonen, $n = 10$ ohne Chitinhülle, $n = 8$ C27D9.1 (RNAi) und $n = 3$ *ima-3* (RNAi). Von den insgesamt elf ausgewerteten Embryonen ohne Chitinhülle weist einer Zellzyklendauern auf, die gegenüber allen anderen um etwa 30 % länger sind. Aufgrund dieses abnormen Verhaltens wird er von der weiteren Auswertung in diesem Kapitel ausgeschlossen. Die mit diesem Vorgehen erhaltenen Daten $\langle N \rangle(t)$ sind in Abb. 3.24a dargestellt.

An $\langle N \rangle(t)$ wird nun eine Funktion der Art

$$N(t) = N_0 \cdot 2^{t/\tau_D} \quad (3.23)$$

gefitet (vgl. Abb. 3.24a). Dabei wird $N_0 = 4$ aufgrund der Definition von $\langle N \rangle(t)$ fixiert. Die Zellverdopplungsdauer τ_D ist daher der einzige freie Parameter und einer einfachen Interpretation zugänglich. Es gibt die Zeitspanne an, nach welcher sich die Zellanzahl im Embryo ungefähr verdoppelt hat. Exakt würde dies nur dann gelten, wenn die Zellzyklendauern für alle Zellen konstant wären; das Maß ist somit inhärent unkorrekt, kann jedoch trotzdem als approximative Skala der Entwicklungsgeschwindigkeit herangezogen werden.

Die sich ergebenden Zellverdopplungsdauern für die vier untersuchten Konditionen sind in Abb. 3.24b in Abhängigkeit des embryonalen Gesamtvolumens dargestellt. Sie liegen

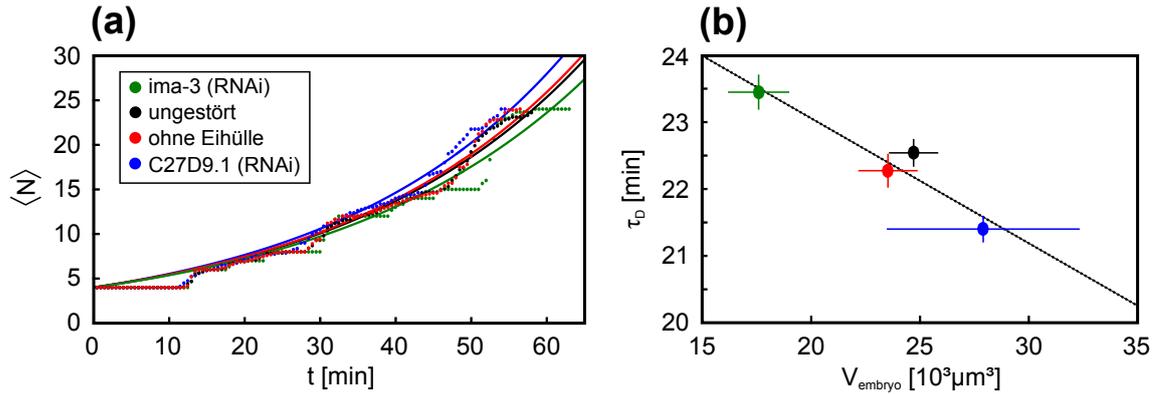


Abbildung 3.24.: Zusammenhang zwischen Zellverdopplungsdauer und embryonalem Gesamtvolumen. (a) Aufgetragen ist die mittlere Zellanzahl $\langle N \rangle$ als Funktion der Zeit für alle vier untersuchten Konditionen (schwarz: $n = 10$ ungestörte Embryonen, rot: $n = 10$ ohne Chitinhülle, grün: $n = 3$ ima-3 (RNAi), blau: $n = 8$ C27D9.1 (RNAi), Linie OD95, 22,5 °C). An diese Daten wurden Kurven gemäß Gl. 3.23 angepasst. Der Fitparameter τ_D beschreibt die Zellverdopplungsdauer und ist ein Maß für die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen. (b) Auftragung der τ_D gegen die embryonalen Gesamtvolumina V_{embryo} gemäß Kap. 3.2.2 für alle vier Konditionen (Farben wie in (a)). Fehlerbalken entsprechen den 95 %-Konfidenzintervallen der Fits bzw. Standardabweichungen der Volumina. τ_D für das Ensemble ungestörter Embryonen unterscheidet sich nicht signifikant von jenem für Embryonen ohne Chitinhülle. Hingegen weisen die kleineren ima-3 (RNAi) Embryonen ein signifikant längeres, die größeren C27D9.1 (RNAi) Embryonen ein signifikant kürzeres τ_D auf. Der zusätzlich eingezeichnete affin-lineare Fit (gestrichelte Linie) dient nur der Veranschaulichung.

generell zwischen 20 min und 25 min und spiegeln somit wie erwartet die frühen Zellzyklendauern wider (vgl. Abb. 3.23). Die Fehlerbalken in Abb. 3.24b entsprechen den 95 %-Konfidenzintervallen der Fits bzw. den Standardabweichungen der Volumina. Der affin-lineare Fit dient nur zur Veranschaulichung (gestrichelte Linie in Abb. 3.24b).

Man erkennt, dass sich die Zellverdopplungsdauern im Rahmen der Konfidenzintervalle für ungestörte Embryonen und solche ohne Chitinhülle nicht unterscheiden. Dies korrespondiert mit der Tatsache, dass sich die embryonalen Gesamtvolumina beider Konditionen ebenfalls nicht signifikant unterscheiden. Für kleinere Embryonen (ima-3 (RNAi)) ergibt sich jedoch eine vergrößerte Zellverdopplungsdauer, während für größere Embryonen (C27D9.1 (RNAi)) ein reduziertes τ_D beobachtet wird. Zwar sind die Änderungen insgesamt klein, aber in Anbetracht der Konfidenzintervalle signifikant. Die relativ geringen absoluten Änderungen können über die Tatsache erklärt werden, dass in den hier untersuchten frühen Stadien mit großen Zellen das volumenunabhängige τ_M der dominante Beitrag in Gl. 3.22 ist.

Auf der Ebene des kompletten Organismus kann somit ein Einfluss des Gesamtvolumens auf die Entwicklungsgeschwindigkeit festgestellt werden. Als Nächstes wird dies für die mittlere Zellzyklendauern der Zellgenerationen untersucht.

Zellzyklendauern im Generationsmittel. An dieser Stelle wird die Auswertung des vorangegangenen Unterkapitels, d.h. die Bestimmung der τ_{CCD} als Funktion von V_{zelle} im Generationsmittel, für alle vier untersuchten Konditionen wiederholt. Am Vorgehen der Auswertung ändert sich dabei nichts. Die ausgewerteten Daten stammen von denselben Aufnahmen wie oben bei der Bestimmung der Zellverdopplungsdauern.

Die damit erhaltenen Generationsmittel der Zellzyklendauern τ_{CCD} sind in Abb. 3.25 nach Zelllinie getrennt gegen das mittlere Zellvolumen aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. Der Wert für P_4 bei der Kondition ima-3 (RNAi) fehlt,

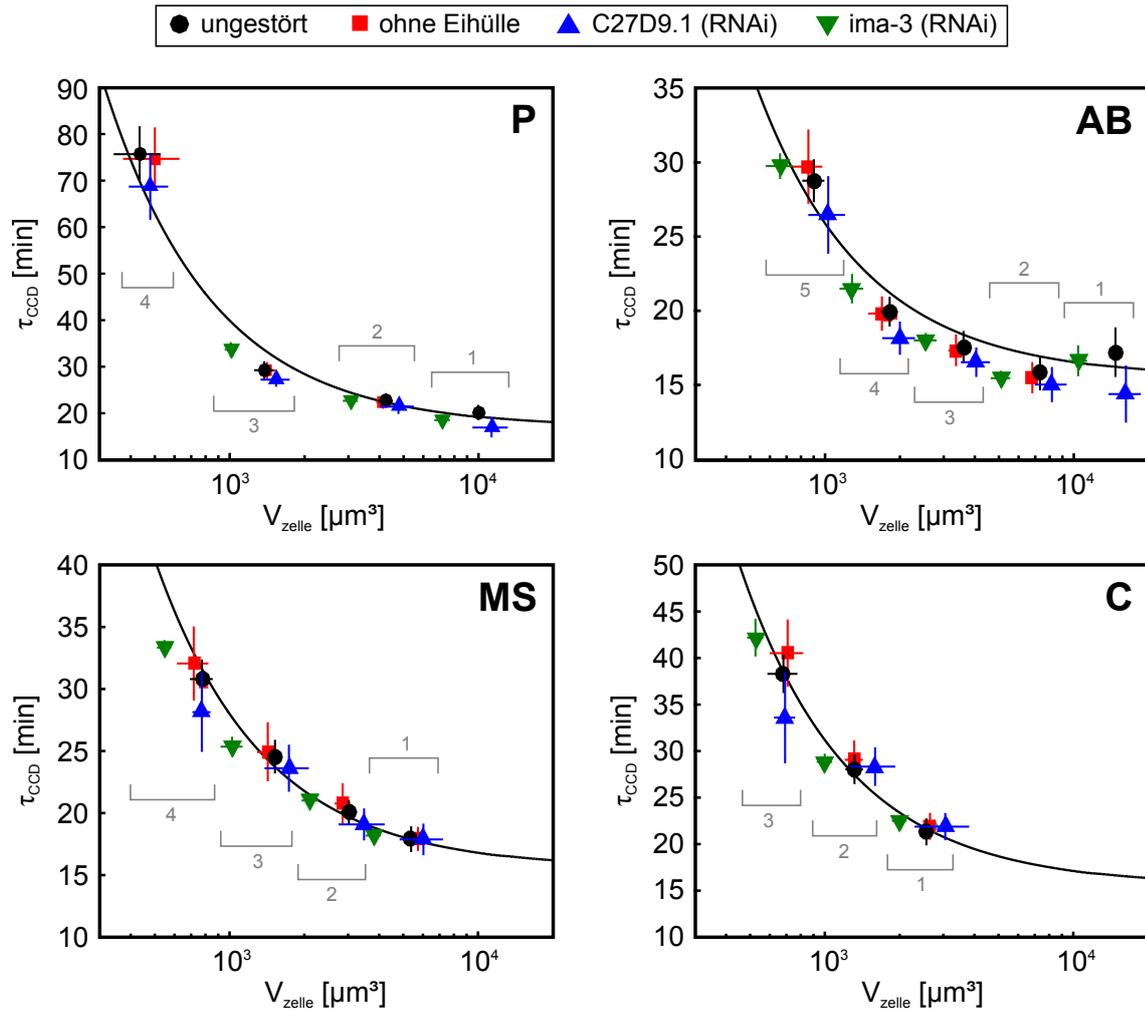


Abbildung 3.25.: Zellzyklendauern im Generationsmittel in gestörten Embryonen. Die Generationsmittel der Zellzyklendauern sind für alle untersuchten Linien (Keimbahn oben links, *AB*-Linie oben rechts, *MS*-Linie mit *EMS* unten links, *C*-Linie unten rechts) und Konditionen (schwarz: $n = 10$ ungestörte Embryonen, rot: $n = 10$ ohne Chitinhülle, grün: $n = 3$ *ima-3* (RNAi), blau: $n = 8$ *C27D9.1* (RNAi)) dargestellt. Die Daten entstammen denselben Aufnahmen wie in Abb. 3.24. Zusätzlich eingetragene Fitkurven entsprechen jenen aus Abb. 3.23, sie wurden hier also nicht angepasst. Graue Klammern geben die Zugehörigkeit einzelner Datenpunkte zu den Zellgenerationen an. Man erkennt für die meisten Zellgenerationen aller Zelllinien eine deutliche Aufspaltung mit dem Volumen. Einzelheiten siehe Text.

da diese Zelle sich innerhalb der standardmäßigen Aufnahmedauer von 3 h nicht teilte. Die eingezeichneten Fitkurven sind diejenigen, die im vorangegangenen Unterkapitel an Daten ungestörter Embryonen angefitet wurden (Parameter in Tabelle 3.1); sie wurden hier also nicht an die neuen Daten angepasst. Die in Abb. 3.25 mit eingezeichneten grauen Klammern verdeutlichen die Zugehörigkeit einzelner Punkte zu den Zellgenerationen. Für die überwiegende Mehrheit der Wertepaarungen innerhalb einer Generation gilt, dass die Daten der Kondition *ima-3* (RNAi) am weitesten links, d.h. bei den kleinsten Zellvolumina, liegen. Am weitesten rechts, bei den größten Zellvolumina, liegen die Werte der Kondition *C27D9.1* (RNAi).

Wie man erkennt, folgen die Daten der gestörten Konditionen tendenziell den Fitkurven, ohne dass eine Anpassung nötig erscheint. Die Daten der Kondition *ima-3* (RNAi) sind generell zu kleineren Volumina hin verschoben. Sie zeigen ebenfalls längere Zellzyklendauern.

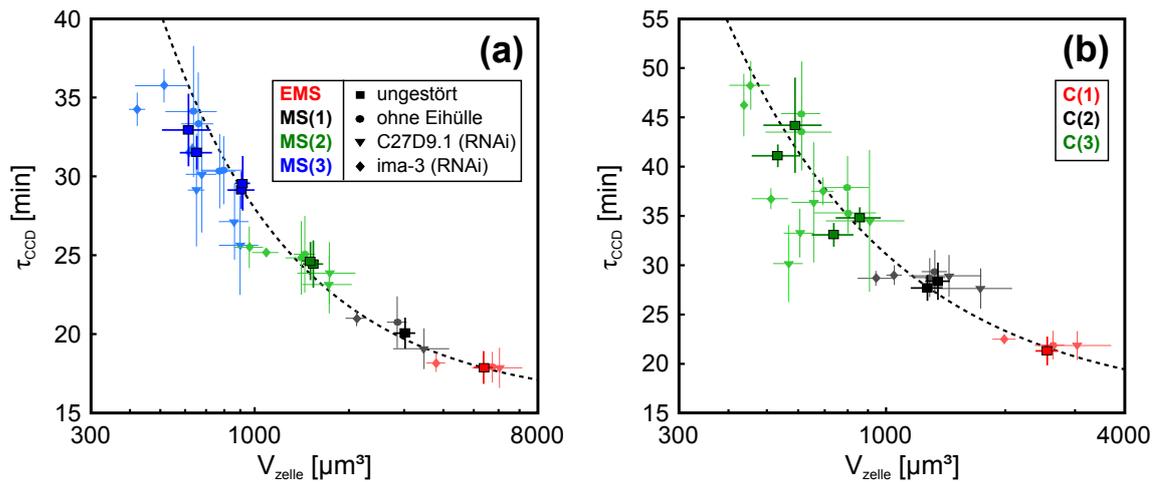


Abbildung 3.26.: Aufspaltung der Zellzyklendauern innerhalb einer Zellgeneration. (a) Die Zellzyklendauern der ersten vier Generationen der *MS*-Linie (rot: *EMS*, schwarz: *MS*, grün: *MS(2)*, blau: *MS(3)*) sind für die jeweiligen einzelnen Zellen aufgetragen. Daten wurden bei vier verschiedenen Konditionen ermittelt (große Quadrate: $n = 10$ ungestörte Embryonen, Punkte: $n = 10$ ohne Chitinhülle, Dreiecke: $n = 8$ C27D9.1 (RNAi), Rauten: $n = 3$ ima-3 (RNAi)). Die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. Durch die auftretenden Asymmetrien der Zellteilungen der zweiten Generation der *MS*-Linie (*MSa* und *MSp*, vgl. Kap. 3.3) zeigen die Zellen der dritten Generation eine deutliche Aufspaltung ihrer Volumina. Als Folge davon sind auch die Zellzyklendauern unterschiedlich und folgen etwa dem eingezeichneten Fit (gestrichelte Linie, Fit aus Abb. 3.23). (b) Wie (a), allerdings für die ersten drei Generationen der *C*-Linie. Auch hier ist infolge asymmetrischer Teilungen eine Aufspaltung der Zellvolumina der dritten Generation gegeben. Mit Ausnahme der Kondition C27D9.1 (RNAi) folgen die daraus resultierenden Zellzyklendauern auch hier dem Fit. Einzelheiten siehe Text.

Andererseits sind die gemessenen Zellzyklendauern bei der Kondition C27D9.1 (RNAi) in der Mehrheit der Fälle zu kleineren Zeiten hin verschoben, während die Zellvolumina zunehmen. Die Daten von Embryonen ohne Eihülle unterscheiden sich in den meisten Fällen nur unwesentlich von jenen ungestörter Embryonen. Die auftretenden Abweichungen können auf die - auch bei *C. elegans* - unweigerlich auftretende Variabilität ablaufender Prozesse, Messfehler (insbesondere bei der Volumenbestimmung kleiner Zellen) sowie kleine Stichprobengrößen zurückgeführt werden.

Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass Zellvolumen und Zellzyklendauern auf der Ebene der Generationsmittel tatsächlich kausal zusammenhängen.

Zellzyklendauern innerhalb der Zellgenerationen. Die Analyse des vorherigen Abschnittes wird nun weiter untergliedert und auf einzelne Zellen innerhalb einer Zellgeneration angewendet. In Kap. 3.3 konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Zellen *MSa*, *MSp*, *Ca* und *Cp* signifikante geometrische Asymmetrien bei ihrer Teilung aufweisen. Als Folge ergeben sich Tochterzellen, deren Volumina sich um bis zu 60 % unterscheiden. Daher sollten sich gemäß den bisherigen Erkenntnissen dieses Kapitels auch in deren Zellzyklendauern Unterschiede zeigen. Um dies zu testen, wird die Vorgehensweise des vorangegangenen Abschnittes hier für die Zelllinien *MS* und *C* wiederholt, wobei diesmal auf eine Mittelung über Zellgenerationen verzichtet wird.

Die Ergebnisse sind, nach Generation und Kondition aufgeschlüsselt, in Abb. 3.26 dargestellt (ungestörte Embryonen: große Symbole, andere Konditionen: kleine Symbole). Die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. Die eingezeichneten Fitkurven sind auch hier nicht an die aktuell dargestellten Daten angepasst, sondern entsprechen den in Abb. 3.23 abgebildeten.

Gemäß der Vorhersage ist auch innerhalb einer Kondition eine deutliche Aufspaltung der τ_{CCD} mit dem Volumen erkennbar. Dies gilt vor allem für die vierte Generation der *MS*-Linie (blaue Punkte in Abb. 3.26a) sowie die dritte Generation der *C*-Linie (grüne Punkte in Abb. 3.26b). Die jeweils kleineren posterioren Zellen (*MSap* & *MSpp* sowie *Cap* & *Cpp*) haben signifikant kürzere Zellzyklendauern als ihre anterioren, größeren Schwesterzellen (*MSaa*, *MSpa*, *Caa* & *Cpa*). Ähnliche Ergebnisse ergeben sich für alle vier untersuchten Konditionen. Die einzige Ausnahme von diesem Schema findet sich in der *C*-Linie bei der Kondition C27D9.1 (RNAi) (grüne Dreiecke in Abb. 3.26b). Ein Grund für diese Abweichung kann hier nicht gegeben werden. Eine mögliche Erklärung sind wieder statistische Fluktuationen und kleine Stichprobengrößen. Nach den Ergebnissen aus Kap. 3.3 nimmt die Asymmetrie der Teilungen in den Zellen *MSa*, *MSp* und *Cp* ab, wenn die Chitinhülle entfernt wird. In der Folge weisen ihre Tochterzellen ähnlichere Volumina auf, so dass sich auch deren Zellzyklendauern annähern sollten. Der Effekt ist allerdings relativ klein und kann wegen der relativ großen Standardabweichungen der Zellzyklendauern hier nicht eindeutig festgestellt werden.

Die oben beschriebene Aufspaltung wird durch die Fits gemäß Gl. 3.22 in guter Näherung beschrieben. Diese gelten damit auch auf einer Ebene (einzelne Zellen innerhalb einer Generation), die zu ihrer Bestimmung überhaupt nicht herangezogen wurde.

Insgesamt konnte damit in diesem Kapitel gezeigt werden, dass das Zellvolumen die Zellzyklendauer kausal beeinflusst. Eine Änderung der Zellgrößen hat Einfluss auf die mittleren Zellzyklendauern und damit auch auf die gesamte Entwicklungsgeschwindigkeit eines Embryos. Zudem wurde an dieser Stelle klar, dass geometrisch asymmetrische Zellteilungen somatischer Zellen, auch wenn sie nicht biochemisch/genetisch verursacht sind, dennoch reale Folgen für die Entwicklung eines Embryos haben (vgl. Kap. 3.3).

Zu Beginn dieses Kapitels wurde bereits die Temperaturabhängigkeit von τ_{P-A} untersucht. Im nächsten Unterkapitel wird diese Analyse nun auf die Größen τ_{CCD} , τ_D , α und τ_M ausgeweitet.

Zellzyklendauern hängen exponentiell von der Temperatur ab

Um die Temperaturabhängigkeit der gesamten Zellzyklendauer zu untersuchen, werden Aufnahmen der Linie XA3501 herangezogen. Die Zellzyklendauern wurden aus diesen Aufnahmen vollständig manuell ausgelesen (Anaphase bis Anaphase)².

Im Unterschied zu den oben verwendeten Aufnahmen der Linie OD95 können aus den hier verwendeten Bildern die Zellvolumina nicht bestimmt werden, da die Plasmamembranen nicht fluoreszenzmarkiert sind. Aus diesem Grund werden für V_{zelle} Daten der Linie OD95 verwendet ($n = 10$ ungestörte Embryonen bei 22,5°C). In Anbetracht der geringen Schwankungen erscheint dies als gerechtfertigt (vgl. hierzu die Gegenüberstellung der gemessenen Zellvolumina der Linien OD58 und OD95 in Kap. 3.2.1). Eine mögliche Abhängigkeit der Teilungsverhältnisse von der Umgebungstemperatur wird dabei vernachlässigt. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht (vgl. Kap. 3.3). Die Ergebnisse bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Zellkernbewegung (Kap. 3.1.1) legen allerdings den Schluss nahe, dass die Temperatur keinen Einfluss auf die Teilungsverhältnisse hat. Dort wurde gezeigt, dass sich die Zellkernbewegung (auch während der Mitose) und Zellzyklendauern auf die gleiche Weise mit der Temperatur ändern.

²Der Grund für die manuelle Bestimmung der Zellzyklendauern an dieser Stelle ist historischer Natur. Die Auswertung der Daten erfolgte, bevor der in Kap. 2.2.1 beschriebene Arbeitsablauf vollständig entwickelt war. Dies hat auf die Qualität der Daten jedoch keinen Einfluss, da der Beginn der Anaphase sowohl per Auge als auch durch das Tracking scharf detektierbar ist. Da sich die Ergebnisse folglich nicht ändern würden, wurde auf eine erneute, automatisierte Auswertung verzichtet.

Die Ergebnisse aus Kap. 3.1.1 sowie die obige Untersuchung von τ_{P-A} legen nahe, dass sich für die gesamten Zellzyklendauern eine Arrhenius-Skalierung ergibt. Während dies für die Zygote P_0 bereits gezeigt ist [114], liegen bisher für alle weiteren Zellen noch keine Daten vor.

Die Zellzyklendauern werden bei fünf Umgebungstemperaturen ausgewertet. Diese sind 15°C ($n = 8$ ungestörte Embryonen), $17,5^\circ\text{C}$ ($n = 7$), 20°C ($n = 10$), $22,5^\circ\text{C}$ ($n = 11$) sowie 25°C ($n = 10$). Da hier nur die Skalierung der Fitparameter α und τ_M von Interesse ist, werden generell Generationsmittel verwendet. Neben den τ_{CCD} wird für jede Umgebungstemperatur zudem die Zellverdopplungsdauer bestimmt. Hierdurch kann abgeschätzt werden, wie die Entwicklungsgeschwindigkeit des gesamten Embryo mit der Temperatur skaliert. Die Bestimmung von τ_D erfolgt gemäß dem weiter oben beschriebenen Vorgehen.

In Abb. 3.27a sind die temperaturabhängigen Daten für die Keimbahn, in Abb. 3.27b hingegen diejenigen der AB -Linie dargestellt. Für die MS - und C -Linie ergeben sich entsprechende Verläufe (nicht gezeigt). Bereits hier wird deutlich, dass sowohl α als auch τ_M invers mit der Temperatur skalieren: Die Fitkurven werden bei sinkender Temperatur "steiler" und deren volumenunabhängige Anteile größer.

Die Zellverdopplungsdauern sind in Abb. 3.27c in einem Arrheniusgraph abgebildet. Fehlerbalken entsprechen den 95 %-Konfidenzintervallen der Fits. Man erkennt, dass sie bei nicht zu hohen Temperaturen ($T < 25^\circ\text{C}$) in guter Näherung einer Arrhenius-Skalierung folgen. Der zusätzlich in Abb. 3.27c eingezeichnete Fit ist von der Art $\tau_D = \tau_0 \cdot e^{T_0/T}$ (aufgrund der Abweichung wurde τ_D bei 25°C nicht zum Fitten verwendet). Dabei ergibt sich für den Skalierungsparameter $T_0 = 8031\text{ K}$. Für die Temperaturabhängigkeit der Zyklendauer der Zygote P_0 wurde ein Skalierungsparameter $T_0 \approx 8700\text{ K}$ publiziert [114], beide Werte stimmen damit gut überein. Die Abweichungen bei 25°C sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei dieser Temperatur der fortpflanzungsfähige Temperaturbereich für *C. elegans* endet. Bei der Bestimmung der Zellzyklendauer der Zygote P_0 traten bei dieser Temperatur ebenso erste größere Abweichungen auf [114]. Für die Zellverdopplungsdauer ergibt sich ein Q_{10} -Wert von etwa 2,3, was den Erwartungen entspricht.

In Abb. 3.27d sind die Fitparameter α für alle vier untersuchten Zelllinien in einem Arrheniusgraph eingezeichnet (Fehlerbalken entsprechen 90 %-Konfidenzintervallen). Die Skalierung der Parameter mit der Temperatur ist konsistent mit der von τ_D . Die eingezeichneten Fitkurven (gestrichelte Linien) sind von der Art $\alpha = \alpha_0 e^{T_0/T}$, wobei hier T_0 auf den oben genannten Wert $T_0 = 8031\text{ K}$ fixiert ist. Die jeweils einzigen freien Parameter sind damit α_0 . Die relativ großen unsystematischen Schwankungen können durch die Art der Bestimmung der α erklärt werden. Zum Fitten von Gl. 3.22 an die experimentellen Daten stehen jeweils nur (3-5) Datenpunkte (Zellgenerationen) zur Verfügung. Die Fitparameter sind damit anfällig für Fluktuationen durch natürliche Variationen oder Messfehler. Es wird darauf hingewiesen, dass α generell einer inversen Arrhenius-Skalierung folgt. Dies deutet darauf hin, dass es von einer inversen biochemischen Rate abhängt. Weiterhin erkennt man, dass die bereits vorher angesprochene Relation $\alpha_P > \alpha_C > \alpha_{MS} > \alpha_{AB}$ über den gesamten getesteten Temperaturbereich gilt.

Schließlich sind in Abb. 3.27e die Fitparameter τ_M für die Keimbahn und somatische Zelllinien abgebildet. Die Fehlerbalken der Daten der Keimbahn entsprechen 90 %-Konfidenzintervallen. Für die somatischen Linien kann aufgrund des Vorgehens beim Fitten (siehe oben) kein Fehler angegeben werden. Im Gegensatz zu α folgt τ_M nicht der Skalierung von τ_D . Es hängt deutlich schwächer von der Temperatur ab und zeigt den gleichen Verlauf wie τ_{P-A} . So sind die eingezeichneten Fitkurven (Linien) von der Art $\tau_M = \tau_0 e^{T_0/T}$, wobei hier $T_0 = 4406\text{ K}$ (mittlerer Wert für τ_{P-A}) fixiert ist (τ_0 frei). Es

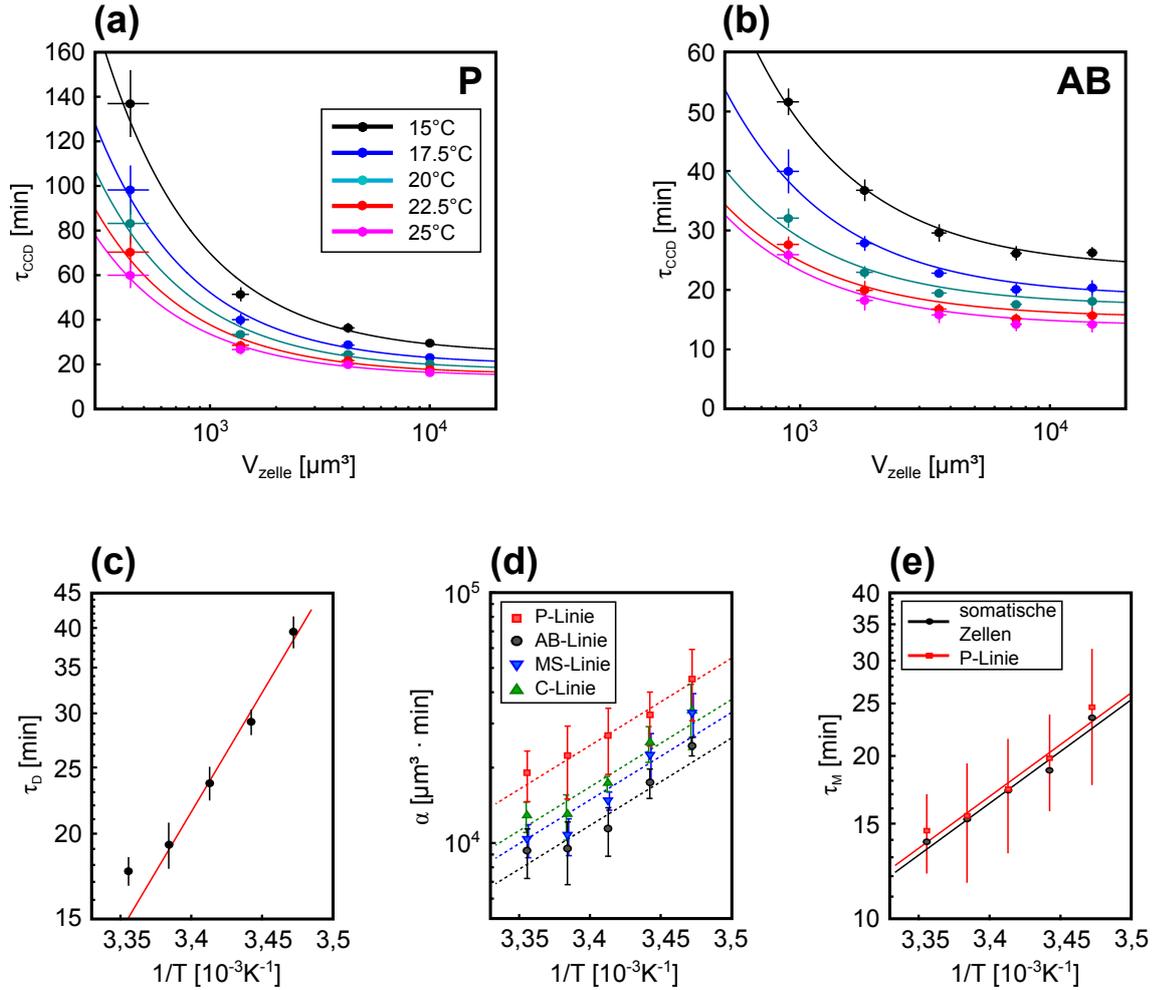


Abbildung 3.27.: Temperaturabhängigkeit der Zellzyklendauer. (a) Die Zellzyklendauern τ_{CCD} der Keimbahn sind gegen die Zellvolumina V_{zelle} für unterschiedliche Temperaturen im Generationsmittel aufgetragen (schwarz: 15 °C, blau: 17,5 °C, cyan: 20 °C, rot: 22,5 °C, magenta: 25 °C). Die Zellzyklendauern wurden aus Aufnahmen der Linie XA3501 manuell bestimmt ($n = (7 - 11)$, siehe Text). Die Zellvolumina stammen aus Aufnahmen ungestörter Embryonen der Linie OD95 ($n = 10$, 22,5 °C, siehe Text). Die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. (b) Wie (a), allerdings für Zellgenerationen der AB-Linie. Für die MS- und C-Linie ergeben sich ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt). (c) Die Zellverdopplungsdauern (Punkte, bestimmt wie bei Abb. 3.24, Fehlerbalken entsprechen 95%-Konfidenzintervallen) folgen einer Arrhenius-Skalierung. Ein Fit der Art $\tau_D = \tau_0 e^{T_0/T}$ beschreibt die Daten quantitativ (rote Linie, $T_0 = 8031$ K). Abweichungen bei 25 °C sind wahrscheinlich auf das Ende des fortpflanzungsfähigen Bereiches bei dieser Temperatur zurückzuführen [114]. (d) Die Parameter α zeigen die gleiche Arrhenius-Skalierung wie τ_D (rot: Keimbahn, schwarz: AB-Linie, blau: MS-Linie, grün: C-Linie). Fehlerbalken entsprechen 90%-Konfidenzintervallen. Die eingezeichneten Fits sind von der Art $\alpha = \alpha_0 e^{T_0/T}$ mit fixiertem $T_0 = 8031$ K. (e) Die Parameter τ_M für die Keimbahn (rote Quadrate, Fehlerbalken entsprechen 90%-Konfidenzintervallen) und die somatischen Linien (schwarze Punkte, ohne Fehlerbalken, siehe Text) folgen der Skalierung der τ_{P-A} ($\tau_M = \tau_0 e^{T_0/T}$ mit $T_0 = 4406$ K, schwarze und rote Linien).

zeigt sich wieder, dass τ_M für die Keimbahn (mit Ausnahme bei 20 °C) größer als für die somatischen Zellen ist. Ferner gibt die Art der Temperaturskalierung von τ_M einen zusätzlichen Hinweis darauf, dass es hauptsächlich die Dauer der M-Phase beschreibt.

Modellierung der Interphasendauer mittels limitierender Komponenten

Anhand der bisherigen Erkenntnisse soll ein Modell zur Erklärung der Interphasendauer τ_s entwickelt werden. Die relevanten Ergebnisse werden daher kurz zusammengefasst. Erstens konnte gezeigt werden, dass zwischen τ_s und dem Zellvolumen ein indirekter proportionaler Kausalzusammenhang besteht: $\tau_s = \alpha/V_{zelle}$. Der vermittelnde Parameter α hängt von der Zelllinie ab. Für die Keimbahn ist er gegenüber allen somatischen Linien um einen Faktor (1,5-2,5) signifikant erhöht. Auch innerhalb der somatischen Linien ergeben sich Unterschiede, wobei α umso größer ist, je später die Zelllinie durch Teilung einer P -Zelle erzeugt wird ($\alpha_C > \alpha_{MS} > \alpha_{AB}$). Des Weiteren zeigt α eine inverse Arrhenius-Skalierung mit der Temperatur.

Die vom Zellvolumen unabhängige Dauer der M -Phase, τ_M , wird im Folgenden als gegeben betrachtet und nicht weiter erklärt. Die M -Phase setzt sich aus vielen Teilabschnitten zusammen, wobei die Volumenunabhängigkeit für jeden einzelnen erklärt werden müsste (wie bereits erwähnt, ist dies z.B. für die Cytokinese bereits erfolgt [223], siehe auch Diskussion, Kap. 3.5.3).

Konzept. Die Art der indirekten Skalierung, $\tau_s \propto V_{zelle}^{-1}$, legt ein auf limitierenden Komponenten basierendes Modell nahe, wie es schon in Kap. 3.4 zur Erklärung der finalen Nukleusvolumina verwendet wurde. Es wird angenommen, dass es eine Komponente χ gibt, die für den Eintritt in die M -Phase, d.h. das Ende der Interphase, ratenlimitierend ist. Andere Prozesse, die in einer Signalkaskade parallel oder vor-/nachgeschaltet ablaufen, finden hingegen auf kürzeren Zeitskalen statt, womit ihr Einfluss in erster Näherung vernachlässigt werden kann. Aufgrund unwesentlicher Transkription zu Beginn der Embryogenese wird die Gesamtzahl der Moleküle oder Molekülkomplexe χ im Embryo, N_0 , als konstant angenommen. Wie schon in Kap. 3.4 kann aufgrund der offenen Mitose in jedem Fall angenommen werden, dass χ bei Zellteilungen gemäß des Volumenverhältnisses der Tochterzellen auf diese verteilt wird. Jede Zelle enthält somit im Mittel eine Anzahl $N \propto V_{zelle}$ von χ . Die Grundannahme des im folgenden entwickelten Modells ist nun, dass die Zellen umso schneller in Mitose eintreten, je höher die Anzahl der vorhandenen Moleküle/Komplexe χ ist: $\tau_s \propto N^{-1} \propto V_{zelle}^{-1}$.

Konkretisierung. Diese Argumentation soll nun in ein konkretes, mit bisherigen biologischen Erkenntnissen möglichst konsistentes Modell überführt werden. Die Rolle der limitierenden Komponenten übernehmen in dem Modell die Kernporen (NPCs). Es soll bereits hier darauf hingewiesen werden, dass diese Rolle im realen Embryo durchaus auch von anderen Proteinen oder Zellstrukturen eingenommen werden kann, d.h., anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann die biologische Richtigkeit nicht bestätigt werden. Es ist jedoch die einfachste denkbare Implementierung, die mit nahezu allen Beobachtung übereinstimmt. Abb. 3.28 gibt eine schematische Übersicht über die im Modell relevanten Komponenten.

In der Einleitung dieses Kapitels (Kap. 3.5.1) wurden Zellzyklenoszillatoren eingeführt. Dabei wurde auch auf die Tatsache eingegangen, dass Transkription in den frühen Stadien der Embryogenese keine Rolle spielt. Die im Embryo vorhandenen Cycline (insb. das für den Eintritt in die Mitose wichtige Cyclin B) werden daher wahrscheinlich nicht zyklisch gebildet und abgebaut, sondern ändern nur ihren Bindungszustand.

In dem hier entwickelten Modell wird der Einfluss der Bindungskinetik zwischen Cyclin B und Cdk1 sowie die Aktivierung des gebundenen Cdk1 vernachlässigt. Es wird somit davon ausgegangen, dass die effektiv vorliegende Gesamtmenge aktivierter MPFs (Cyclin B + Cdk1) während der Interphase zu allen Zeiten ungefähr konstant ist. Die zugrunde

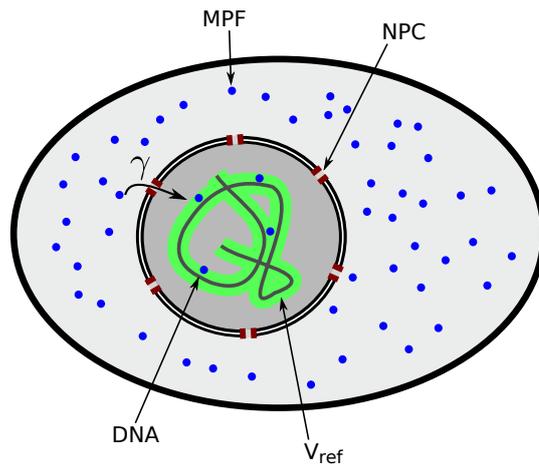


Abbildung 3.28.: Schema des Modells limitierender Komponenten. In dem Modell wird die Mitose von einer kritischen Anzahl an MPF innerhalb des Kerns, in einem Referenzvolumen V_{ref} , das z.B. um die DNA lokalisiert ist, ausgelöst. Am Anfang befinden sich die MPFs im Cytoplasma und müssen somit in den Kern transportiert werden. Als ratenlimitierend wird hier die Passage durch die NPCs mit einer Translokationsrate von γ je NPC angenommen.

liegende Annahme ist, dass die Bildung und Aktivierung der MPFs auf kürzeren Zeitskalen abläuft als die Akkumulierung der Komplexe im Zellkern (siehe unten). Während der offenen Mitose verteilen sich MPFs bzw. deren Komponenten gleichmäßig im Cytoplasma. Dies hat zur Folge, dass die initiale cytoplasmatische Konzentration c_0 nicht von der Zellgröße abhängt und für alle Zellen gleich ist (der Einfluss der Zelllinie wird später diskutiert). Während der Mitose kann dennoch eine Deaktivierung der MPFs stattfinden.

In der Einleitung dieses Kapitels wurde ebenfalls darauf eingegangen, dass sich MPFs im Zellkern anreichern müssen, um die Mitose zu initiieren. Die Anreicherung wird dabei räumlich nahe an denjenigen Strukturen erfolgen, an welchen die Mitose ausgelöst wird, z.B. direkt an der DNA oder an den zu bildenden Kinetochoren (siehe Kap. 3.5.1). Für das hier entwickelte Modell kann dies in die Annahme umformuliert werden, dass eine kritische Anzahl n_c der MPFs nahe der relevanten Strukturen die Mitose einleitet. Da alle infrage kommenden Strukturen (DNA, Kinetochore, etc.) in jeder Zelle in gleicher Anzahl vorliegen, ist auch n_c für alle Zellen gleich. Es erweist sich als vorteilhaft, die kritische Anzahl in eine Konzentration umzurechnen. Hierzu wird ein Referenzvolumen V_{ref} eingeführt, in welchem sich die MPFs sammeln müssen. Nach obigem Argument ist auch V_{ref} für alle Zellen identisch und somit insbesondere unabhängig von der Zell- und Zellkerngröße. Die Mitose wird also eingeleitet, sobald die kritische MPF-Konzentration $a_c = n_c/V_{ref}$ erreicht ist (*integrate-and-fire*-Prozess).

In Kap. 3.4 über die Nukleusgrößen legt die Zellgrößen- und Temperaturabhängigkeit des Nukleuswachstums ein diffusionslimitiertes Modell nahe. Auch bei Zellzyklenoszillatoren muss ein Transport in den Kern, diesmal der der MPFs, stattfinden. Die in diesem Kapitel gemessene exponentielle Temperaturabhängigkeit der Zellzyklenlängen weist jedoch nicht auf einen diffusions-, sondern auf einen reaktionslimitierten Mechanismus hin. Der Transport zum Zellkern findet (in dem Modell) somit deutlich schneller statt als der reaktive Transport in den Kern. Als "Flaschenhals", d.h. ratenlimitierendes Element, dient daher in dem Modell der Transport durch die Kernporen (vgl. Kap. 1.1.1).

Die Translokalisierung der MPFs durch die NPCs ist ein komplexer Prozess. Zuerst muss das Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*, eine Signalsequenz an den

zu importierenden Proteinen) der MPFs von den Importinen erkannt werden. Die Importine müssen sodann an die MPFs binden. Schließlich wird der so gebildete Komplex durch die Kernporen in den Kern geschleust [7]. Diese aus mehreren Einzelschritten bestehende Reaktion wird an dieser Stelle effektiv als chemische Reaktion erster Ordnung angenommen, womit die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Konzentration des primären Eduktes MPF abhängt (Massenwirkungsgesetz). Die Abhängigkeit von der Importin-Konzentration wird hier also vernachlässigt³. Die Transportrate, d.h. der Geschwindigkeitskoeffizient der Reaktion, pro NPC sei γ . Unter den beschriebenen Annahmen folgt in diesem Fall die zeitliche Änderung der nuklearen MPF-Konzentration $a(t)$ der Gleichung

$$\frac{da(t)}{dt} = N\gamma c(t) \approx N\gamma(c_0 - a(t)) \quad (3.24)$$

mit N als der Anzahl der NPCs in der Zelle und der cytoplasmischen MPF-Konzentration $c(t)$. Für die zweite Gleichsetzung wurde Teilchenzahlerhaltung benutzt und $V_{cyto} \approx V_{zelle}$ genähert (vgl. Kap. 3.4).

Die Lösung von Gl. 3.24 mit der Anfangsbedingung $a(t=0) = 0$ lautet

$$a(t) = c_0 (1 - e^{-N\gamma t}). \quad (3.25)$$

Zur Rechtfertigung der gewählten Anfangsbedingung sei angemerkt, dass sich die Kernmembran bereits am Ende der M -Phase ausbildet. Da die Konzentration aktivierter MPFs während der M -Phase typischerweise stark absinkt (z.B. infolge Deaktivierung), kann eine initial im Kern vorhandene Konzentration vernachlässigt werden.

Im Modell tritt die Zelle in Mitose ein, sobald $a(t) = a_c$ gilt. Die Dauer der Interphase ergibt sich damit aus Gl. 3.25 zu

$$\tau_S = -\frac{1}{N\gamma} \ln \left(1 - \frac{a_c}{c_0} \right). \quad (3.26)$$

Aus Gründen der Einfachheit wird hier die - biologisch nicht weiter belegbare - Annahme gemacht, dass das Verhältnis a_c/c_0 klein ist. Dies ist gleichbedeutend mit der Annahme, dass sich die cytoplasmische MPF-Konzentration durch den Transport in den Kern kaum ändert. Dies erscheint gerade für die hier untersuchten frühen Blastomere mit hohen absoluten Proteinanzahlen plausibel. In diesem Fall kann der Logarithmus in Gl. 3.26 linearisiert werden und es folgt

$$\tau_S = \frac{a_c}{N\gamma c_0}. \quad (3.27)$$

Die folgenden Überlegungen sind auch ohne diese Näherung gültig, dann müsste allerdings Gl. 3.26 anstelle von Gl. 3.27 verwendet werden.

Die Kernporen als limitierende Komponente verhalten sich wie oben beschrieben. Im gesamten Embryo liegen N_0 NPCs vor, wobei $N_0 \approx \text{const}$ wegen fehlender Transkription gilt (der Einfluss dieser Annahme wird weiter unten eingehend untersucht). Bei offenen Zellteilungen werden die NPCs gemäß dem Verhältnis der Tochterzellvolumina aufgeteilt. Pro Zelle liegen daher im Mittel

$$N = N_0 \frac{V_{zelle}}{V_{embryo}} \quad (3.28)$$

³Die Bildung der Komplexe MPF+Importin ist mindestens eine Reaktion zweiter Ordnung, daher hängt die Reaktionsgeschwindigkeit vom Produkt der Konzentrationen ab. Da die Importin-Konzentration als ungefähr konstant angenommen werden kann (keine Transkription), spielt sie in diesem Kontext keine explizite Rolle.

Kernporen vor.

Die Kombination von Gl. 3.27 und Gl. 3.28 liefert schließlich

$$\tau_S = \frac{a_c V_{embryo}}{N_0 \gamma c_0} \cdot \frac{1}{V_{zelle}}. \quad (3.29)$$

Dies ergibt den beobachteten inversen Zusammenhang zwischen der Dauer der Interphase und dem Zellvolumen. Ein Vergleich mit Gl. 3.22 liefert zudem

$$\alpha = \frac{a_c V_{embryo}}{N_0 \gamma c_0}. \quad (3.30)$$

Die gesamte Zellzyklendauer ergibt sich abschließend (vgl. Gl. 3.22) zu

$$\tau_{CCD,theo} = \tau_S + \tau_M = \frac{\alpha}{V_{zelle}} + \tau_M = \frac{a_c V_{embryo}}{N_0 \gamma c_0} \cdot \frac{1}{V_{zelle}} + \tau_M. \quad (3.31)$$

Zusammenfassend werden in dem Modell die Dauern der Interphase durch einen *integrate-and-fire*-Prozess festgelegt. Die MPF-Konzentration in einem nuklearen Referenzvolumen steigt als Funktion der Zeit an und beim Erreichen einer kritischen Konzentration wird schließlich die *M*-Phase initiiert. Der Transport der MPFs in den Kern durch die Kernporen wird als langsamster und somit ratenlimitierender, auftretender Prozess angenommen. Daher bestimmt dieser Transport maßgeblich die Dauer der Interphase. Je mehr NPCs in einer Zelle vorliegen, desto schneller können die MPFs transportiert werden, und desto schneller wird die kritische Konzentration im Referenzvolumen erreicht. Da die Gesamtzahl der NPCs im Embryo ungefähr konstant ist, haben kleine Zellen weniger NPCs und brauchen folglich länger, um die Interphase abzuschließen.

Es sei nochmals angemerkt, dass dieses konkrete Modell nur eine mögliche biologische Implementierung eines Mechanismus ist, der auf limitierenden Komponenten aufbaut. Es ist jedoch das einfachste biologisch konsistente Modell und mit weiteren Beobachtungen im Einklang (siehe hierzu auch Diskussion, Kap. 3.5.3).

Gründe für die Linienabhängigkeit des Skalierungsparameters α . Weiter oben wurde gezeigt, dass die Zelllinien unterschiedliche Parameter α aufweisen. Den höchsten Wert, d.h. den stärksten Zusammenhang zwischen Zellvolumen und Interphasendauer, zeigt die Keimbahn. Dort ist α etwa doppelt so groß wie in den somatischen Linien. Innerhalb der somatischen Linien sind die α -Werte umso kleiner, je früher die Zelllinie während der Entwicklung entsteht ($\alpha_{AB} < \alpha_{MS} < \alpha_C$).

Gemäß Gl. 3.30 hängt α innerhalb des Modells von vier Größen ab: der Gesamtzahl der NPCs, N_0 , der cytoplasmischen Konzentration aktivierter MPFs, c_0 , der Translokalisierungsrate pro NPC, γ , sowie der kritischen Konzentration a_c . Letztere ist innerhalb des Modells eine Konstante, d.h., sie hängt weder von der Zellgröße noch von der Zelllinie ab. Um einen Übergang in die *M*-Phase auszulösen, muss in jeder Zelle die gleiche kritische Konzentration erreicht werden. Die Unterschiede in der Skalierung der Zelllinien müssen folglich anhand der drei verbleibenden Größen N_0 , c_0 und γ erklärt werden. Es gibt dabei für alle drei Hinweise auf Relevanz, wobei Unterschiede letztendlich immer auf biochemisch asymmetrische Zellteilungen zurückgeführt werden können:

- **Einfluss von γ .** Ein allgemeiner Unterschied zwischen somatischen und Keimbahnzellen sind deren unterschiedliche biochemische Zusammensetzungen. Keimbahnzellen sind die einzigen Blastomere, in welchen sog. P-Granulen vorkommen [224]. Diese sind membranlose Tröpfchen, bestehend aus RNA und Proteinen [224]. Es konnte

gezeigt werden, dass P-Granulen bevorzugt an NPCs koppeln [225, 226]. Es ist daher plausibel, dass sie eine Transportbarriere für die MPFs darstellen und somit die effektive Transportrate γ reduzieren: $\gamma \rightarrow \gamma' < \gamma$. Da γ invers in Gl. 3.30 eingeht, führt dies zu einer Erhöhung des α -Wertes in der Keimbahn gegenüber somatischen Linien. Dieser Umstand kann den großen Unterschied zwischen der *P*-Linie und den somatischen erklären, jedoch nicht den Unterschied innerhalb der somatischen Linien, da keine dieser Linien über P-Granulen verfügt.

- **Einfluss von c_0 .** In der Einleitung dieses Kapitels (Kap. 3.5.1) wurde darauf hingewiesen, dass bei der asymmetrischen Teilung der Zygote auch Cdk1-aktivierende Proteine ungleich verteilt werden: die Konzentrationen von PLK-1 und Cdc-25 sind in *AB* höher als in *P*₁ [218–220]. Dies kann zu einer effektiven Erhöhung der Konzentration aktiver MPFs, c_0 , in der somatischen *AB*-Linie gegenüber der Keimbahn führen. Da auch c_0 invers in Gl. 3.30 eingeht, wäre in diesem Fall ein kleinerer α -Wert für die *AB*-Linie zu erwarten. Die Ergebnisse aus Kap. 3.3 legen den Schluss nahe, dass Proteingradienten, die in der Zygote vorhanden sind, auch in späteren Keimbahnzellen auftreten. Somit würden auch spätere somatische Linien (*MS* und *C*) gegenüber der Keimbahn erhöhte Konzentrationen c_0 aufweisen. Die absoluten Konzentrationen in den somatischen Linien müssen allerdings nach wiederholt asymmetrischen Teilungen nicht notwendigerweise gleich sein, wodurch sich die detektierten Unterschiede zum Teil erklären ließen.
- **Einfluss von N_0 .** Durch die Annahme $N_0 = \text{const}$ sinkt die Anzahl der NPCs pro Zelle exponentiell mit der Zellgeneration ab. Dies ist schlussendlich im Modell für die Skalierung $\tau_s \propto V_{zelle}^{-1}$ verantwortlich. Als Rechtfertigung für diese Annahme wurde angeführt, dass in den frühen Stadien der Embryogenese Transkription keine Rolle spielt. Wird Transkription vollständig unterbunden, treten Abweichungen vom ungestörten Verhalten erst ab der Gastrulation auf [57–59]. Dies entspricht ungefähr dem Ende des hier beobachteten Zeitraumes. Allerdings weisen in ungestörten Embryonen nur Keimbahnzellen eine tatsächlich deaktivierte Transkription auf; in somatischen Zellen kann bereits im vierzelligen Zustand Transkriptionsaktivität festgestellt werden [55, 56]. Zudem ist eine Translation maternal vererbter mRNA denkbar, die ebenfalls die Produktion neuer Proteine zur Folge hätte.

Der Fall, dass durch Transkription/Translation laufend neue NPCs produziert werden, entspricht im Modell einer andauernden Erhöhung von N_0 mit der Zeit. Hierdurch sinkt der Wert von α , ebenfalls als Funktion der Zeit. Somit können linien-spezifische Skalierungen der Zellzyklendauern auch eine Folge unterschiedlicher Transkriptions- bzw. Translationsraten sein. Auf eine quantitative Analyse dieses Sachverhaltes für Zustände vor der Gastrulation wird hier verzichtet, da dies im nächsten Abschnitt für spätere Zustände durchgeführt wird. Für frühe Stadien ist der Effekt im Supplement von [195] quantitativ untersucht. Dort zeigt sich, dass für nicht zu große Produktionsraten die theoretisch daraus folgenden Zellzyklendauern immer noch durch Gl. 3.22 beschrieben werden können, wobei der effektiv beobachtete Wert von α umso kleiner wird, je größer die Produktionsrate ist.

Da N_0 und c_0 auf die gleiche Weise in Gl. 3.30 eingehen, sind alle Überlegungen zur steigenden NPC-Anzahl analog für eine steigende MPF-Konzentration gültig.

Zusammenfassend kann also die Linienabhängigkeit von α innerhalb des Modells auf drei mögliche Ursachen zurückgeführt werden. Transportbehinderungen durch P-Granulen sorgen für den signifikanten Unterschied zwischen Keimbahn und somatischen Linien. Eine

linienabhängige Konzentration aktiver MPFs infolge asymmetrischer Teilungen ist in der Lage, diesen Unterschied zu verstärken. Zudem können so Unterschiede innerhalb der somatischen Linien zum Teil rationalisiert werden. Die Produktion neuer NPCs oder MPFs stellt schließlich einen dritten Weg dar, Unterschiede in den erhaltenen α -Werte zu erklären. Die Ergebnisse des nächsten Unterkapitels deuten darauf hin, dass diese letztgenannte Möglichkeit zumindest nicht der dominante Mechanismus bei frühen Zellgenerationen ist.

Abweichungen bei späteren Zellgenerationen können durch einsetzende Transkription erklärt werden

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass bei komplett unterbundener Transkription erste Abweichungen vom ungestörten Verhalten - insbesondere bei Zellteilungszeiten - ungefähr während der Gastrulation auftreten [57–59]. Zu dieser Zeit endet auch etwa der in dieser Arbeit bisher beobachtete Bereich der Embryogenese. Kurz nach dem Beginn der Gastrulation teilen sich die Zellen der fünften *AB*-Generation, die der vierten *MS*-Generation und die der dritten *C*-Generation.

Umgekehrt bedeutet diese Beobachtung, dass bis zu diesem Zeitpunkt Transkription (nahezu) irrelevant ist. Somit ist an dieser Stelle ein Test des entwickelten Modells möglich. Werden die Dauern der Interphase tatsächlich durch limitierende Komponenten determiniert, so sollten sich nach der Gastrulation Abweichungen von dem Verhalten $\tau_S \propto V_{zelle}^{-1}$ zeigen. Zur Herleitung der Interphasendauer wurde explizit von einer Erhaltung der Gesamtzahl der NPCs sowie der MPF-Konzentration ausgegangen. Steigen diese Größen signifikant an, hat dies (wie oben erörtert) eine Verringerung der Zellzyklendauer zur Folge.

Um diese Vorhersage zu testen, werden Aufnahmen benötigt, die die Bestimmung späterer Zellzyklendauern erlauben. Aus diesem Grund werden Langzeitaufnahmen erstellt, in welchen die ersten fünf Stunden der Embryogenese des *C. elegans* enthalten sind (die bisher verwendeten Aufnahmen umfassen drei Stunden bei einer Zeitauflösung von $\Delta t = 30$ s, vgl. Tabelle 2.1). Diese werden an Embryonen der Linie OD95 bei 22,5 °C durchgeführt. Um das Bleichen während der gesamten Aufnahmezeit klein zu halten, wird bei diesen Aufnahmen erstens die Zeitauflösung auf $\Delta t = 60$ s reduziert und zweitens auf eine Aufnahme des Membrankanals verzichtet. Weitere Aufnahmeparameter bleiben unverändert. Bisher wurden $n = 4$ Embryonen aufgenommen und gemäß dem folgenden Schema ausgewertet. Die Messreihe dauert zum jetzigen Zeitpunkt noch an. Die in diesem Unterkapitel präsentierten Ergebnisse sind daher als vorläufig zu verstehen.

Die Bestimmung der Zellzyklendauern erfolgt manuell und im Generationsmittel. Dies liegt darin begründet, dass das Tracking für spätere Zustände mit $N > 50$ Zellen aufgrund zu geringer Auflösung des SPIM immer instabiler wird und somit der Korrekturaufwand stark ansteigt: Die Korrektur eines Trackings bis zum etwa 100-zelligen Zustand dauert mehrere Tage [227]; die Verwendung von *Starrynite* birgt keinen signifikanten Vorteil (vgl. Kap. 2.2.1). Während sich alle Zellen früherer Zellgenerationen innerhalb einer Linie nahezu synchron teilen, sind Zellteilungen späterer Generationen über einen größeren Zeitraum ausgedehnt [214]. Um die mittleren Zellzyklendauern näherungsweise auszulesen, wird daher für jede Generation g der Linie l ($l = AB, MS, C$) der Zeitpunkt $t_{g,l}^{min}$ ausgelesen, bei welchem sich die erste Zelle dieser Generation teilt. Zudem wird der Zeitpunkt $t_{g,l}^{max}$ ausgelesen, bei welchem sich die letzte Zelle dieser Generation teilt. Als Kriterium erfolgter Teilung wird auch hier der Beginn der Anaphase verwendet. Unter der Annahme, dass die Teilungszeiten ungefähr normalverteilt sind, kann somit die mittlere Teilungszeit zu

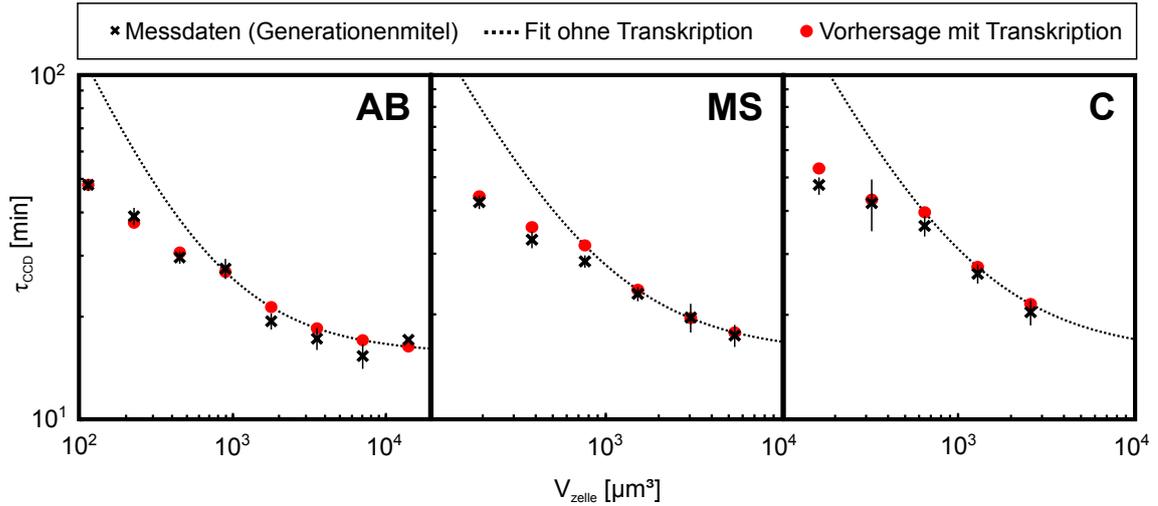


Abbildung 3.29.: Zellzyklendauern späterer Zellgenerationen. Dargestellt sind die Zellzyklendauern in Abhängigkeit von den Zellvolumina (schwarze Kreuze, Mittelwerte und Standardabweichungen im Generationsmittel über $n = 4$ Embryonen der Linie OD95 bei $22,5^\circ\text{C}$). Für Details zu Bildaufnahme und Auswertung siehe Text. Die Daten sind für die *AB*-Linie (links), die *MS*-Linie (Mitte, incl. *EMS*) und die *C*-Linie (rechts) abgebildet. Zudem sind die Fitkurven aus Abb. 3.23 mit eingetragen (gestrichelte Linien, Kurven sind nicht an die dargestellten Daten angepasst). Wie man erkennt, werden die Zyklendauern von den Fitkurven für die ersten fünf *AB*-, die ersten vier *MS*- und die ersten drei *C*-Generationen gut wiedergegeben (dies entspricht Abb. 3.23), danach treten deutliche Abweichungen auf. Wird Transkription in das Modell mit aufgenommen, so können die gemessenen Zellzyklendauern durch Gl. 3.35 quantitativ beschrieben werden (rote Punkte).

$\langle t_{g,l} \rangle = \frac{1}{2}(t_{g,l}^{max} + t_{g,l}^{min})$ abgeschätzt werden. Die Zellzyklendauern im Generationsmittel folgen damit gemäß

$$\tau_{CCD,g,l} = \langle t_{g,l} \rangle - \langle t_{g-1,l} \rangle \quad (3.32)$$

Mit diesem Vorgehen konnten die mittleren Zellzyklendauern der ersten acht Generationen der *AB*-Linie, die der ersten sechs Generationen der *MS*-Linie sowie die der ersten fünf Generationen der *C*-Linie bestimmt werden (bisher: fünf für *AB*, vier für *MS* und drei für *C*; die *P*-Linie bereits vorher gänzlich analysiert). Da der Membrankanal nicht mit aufgenommen wird, sind die Zellvolumina aus den Aufnahmen nicht zugänglich. Diese werden daher im Folgenden abgeschätzt. Hierzu werden die in ungestörten Embryonen der Linie OD95 gemessenen Volumina V_0 der jeweils ersten Zellen einer Linie verwendet (vgl. Kap. 3.2.1), d.h. die Volumen von *AB*, *MS* und *C*. Da sich das Gesamtvolumen aller Zellen innerhalb einer Linie nicht ändern kann, haben die einzelnen Zellen der Generation g im Mittel das Volumen

$$V_g = V_0/2^{g-1}. \quad (3.33)$$

Da aus der Zelle *EMS* die beiden Linien *E* und *MS* hervorgehen, werden hier sowohl für *EMS* als auch für *MS* die tatsächlichen Messwerte verwendet. Zur Rechtfertigung für dieses Vorgehen sei auf den bereits gezeigten Volumenerhalt bei Zellteilungen verwiesen (vgl. Abb. 3.5b). Das mittlere gemessene Zellvolumen in der fünften *AB*-Generation ($471 \mu\text{m}^3$) und V_5 gemäß Gl. 3.33 ($460 \mu\text{m}^3$) unterscheiden sich z.B. nur um 2,5%. Insgesamt können somit die hier verwendeten Zellvolumina und -zyklendauern als Schätzung betrachtet werden.

Die gewonnenen Daten werden über alle $n = 4$ bisher analysierten Embryonen gemittelt und sind in Abb. 3.29 dargestellt (schwarze Kreuze). In die Abbildung sind zusätzlich die

Fitkurven aus Abb. 3.23 mit eingetragen (gestrichelte Linien, die Kurven wurden nicht an die hier gezeigten Daten angepasst). Wie man erkennt, folgen die Daten den Fitkurven für die ersten drei bis fünf Zellgenerationen, d.h. für den Bereich der Entwicklung, der zur Bestimmung der Fitkurven verwendet wurde. Dies zeigt einerseits, dass die gemessenen Daten reproduzierbar sind und validiert andererseits das hier gewählte Vorgehen.

Für spätere Zellgenerationen, d.h. ab der sechsten *AB*-, der fünften *MS*- und der vierten *C*-Generation, treten deutliche Abweichungen vom durch die Fitkurven vorhergesagten Verhalten auf. Dies entspricht genau der oben dargelegten Vorhersage, dass in Zuständen nach dem Beginn der Gastrulation das Modell limitierender Komponenten seine Gültigkeit verliert.

Wie sich zeigt, können auch diese späteren Zellzyklendauern innerhalb des Modells quantitativ beschrieben werden, wenn Transkriptionseffekte mit in Betracht gezogen werden. Hierzu muss die Gesamtanzahl der NPCs $N(t)$ als zeitabhängig approximiert werden. Es wird angenommen, dass Transkription zu Beginn der Gastrulation, d.h. in der fünften *AB*- sowie der vierten *MS*- und der dritten *C*-Generation, einsetzt. Es wird weiterhin angenommen, dass die Gesamtanzahl ab diesem Moment linear mit der Zeit steigt. Die Produktionsrate neuer NPCs sei β . Damit folgt (Gastrulation & Transkriptionsbeginn bei $t = 0$)

$$N(t) = \begin{cases} N_0 & \text{vor der Gastrulation, } t < 0 \\ N_0(1 + \beta t) & \text{nach der Gastrulation, } t \geq 0 \end{cases} \quad (3.34)$$

N_0 ist somit weiterhin die initial vorhandene Anzahl an NPCs. Die Zeit, während der Transkription/Translation zu einer Erhöhung von $N(t)$ beigetragen hat, kann für die g -te Zellgeneration als Summe über die Zellzyklendauern aller vorherigen Zellgenerationen seit Gastrulationsbeginn ausgedrückt werden, $t_g = \sum_{i=g_0}^{g-1} \tau_i$ mit $g_0 = 5, 4, 3$ für $l = AB, MS, C$. τ_i bezeichnet dabei die gesamten Zellzyklendauern gemäß Gl. 3.31. Die Wahl von g_0 , d.h., der ersten Zellgeneration, in welcher Transkription eine Rolle spielt, schließt somit die während dem Gastrulationsbeginn vorhandenen Zellen mit ein. Hiermit kann Gl. 3.31 umgeschrieben werden zu

$$\tau_g = \begin{cases} \frac{\alpha}{V_{zelle}} + \tau_M & \text{falls } g \leq g_0 \\ \frac{\alpha}{V_{zelle}(1 + \beta \sum_{i=g_0}^{g-1} \tau_i)} + \tau_M & \text{falls } g > g_0 \end{cases} \quad (3.35)$$

mit $\alpha = a_c V_{embryo} / (N_0 \gamma c_0)$ gemäß Gl. 3.30. Mit $\beta = 0$ folgt die ursprüngliche Form von Gl. 3.31.

Werden nun für die Parameter α und τ_M der drei untersuchten Zelllinien die Werte aus Tabelle 3.1 fixiert, so können für ein gegebenes β alle Zellzyklendauern berechnet werden. Durch Variation des verwendeten β -Wertes kann so nach einer optimalen Übereinstimmung zwischen Messwerten und Vorhersagen gemäß Gl. 3.35 gesucht werden. Als Kriterium wird hier die kumulierte Abweichung zwischen Messwerten und berechneten Werten verwendet. Dieses beschriebene Vorgehen wird für die *AB*-Linie durchgeführt. Für $\beta = 0,019 \text{ min}^{-1}$ stimmen die Daten am besten überein. Wie sich zeigt, ist Gl. 3.35 mit diesem β tatsächlich in der Lage, alle Zellzyklendauern bis zur achten Generation zu reproduzieren (rote Punkte in Abb. 3.29). Werden nun die Zellzyklendauern der *MS*- und *C*-Linie mit demselben β berechnet, so zeigt sich auch hier eine gute Übereinstimmung (vgl. Abb. 3.29). Eine linienspezifische Anpassung von β ist folglich nicht nötig.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die Zellzyklendauern nach Beginn der Gastrulation deutliche Abweichungen vom Verhalten zeigen, das durch das Modell

limitierender Komponenten vorhergesagt wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die frühen Zellzyklendauern tatsächlich durch limitierende Komponenten maßgeblich bestimmt sind. Ferner kann das Modell um einen linearen Produktionsterm ergänzt werden, womit auch spätere Zellzyklendauern quantitativ richtig beschrieben werden.

3.5.3. Diskussion

Zuerst werden die zentralen Ergebnisse dieses Kapitels stichpunktartig zusammengefasst:

- Die Dauer der Mitose (Pro- bis Anaphase) hängt nicht vom Zellvolumen ab, ist jedoch für Keimbahnzellen erhöht.
- Die Dauer der Interphase hängt invers vom Zellvolumen ab. Der Zusammenhang ist für Keimbahnzellen am stärksten ausgeprägt.
- Wird das Zellvolumen genetisch verändert, so ändern sich auch die Zellzyklendauern gemäß dem inversen Zusammenhang.
- Sowohl die Dauer der Interphase als auch die der M -Phase skaliert exponentiell mit der Temperatur. Die Skalierung ist für die Interphase stärker ausgeprägt.
- Der Zusammenhang zwischen der Dauer der Interphase und dem Zellvolumen kann über ein Modell limitierender Komponenten erklärt werden. Die Rolle der limitierenden Komponente kann z.B. von den Kernporen eingenommen werden, die die Transportrate von MPFs beschränken. Innerhalb dieses Modells kann auch die Lini-enabhängigkeit verstanden werden.
- Für Zustände nach der Gastrulation verliert der einfache inverse Zusammenhang zwischen Zellvolumen und Interphasendauer seine Gültigkeit. Ein auf limitierenden Komponenten basierendes Modell sagt ein solches Verhalten korrekt vorher. Durch die Annahme einer steigenden Gesamtzahl der NPCs können durch das Modell auch spätere Zellzyklendauern quantitativ erfasst werden.

Diskussion der experimentellen Daten & Vergleich mit Ergebnissen anderer Gruppen.

In diesem Kapitel wurden sowohl für τ_{P-A} als auch für die gesamten Zellzyklendauern τ_{CCD} Ensemblemittel über alle untersuchten Embryonen verwendet. In [214] konnte gezeigt werden, dass Embryonen bei gegebener Temperatur über leicht unterschiedliche gesamte Entwicklungsgeschwindigkeiten verfügen. Solche Schwankungen wurden hier folglich nicht beachtet, der Fokus liegt auf dem “*typischen*” Verhalten. Durch die Mittelung wird zudem der aus dem zeitlichen Abstand zweier Bildaufnahmen ($\Delta T = 30$ s) folgende Diskretisierungsfehler abgemildert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Mitose in Form des Teilintervalls τ_{P-A} vom Zellvolumen unabhängig ist. Zwar ist die gewählte Methode zur Bestimmung von τ_{P-A} subjektiv. Da die gewonnenen Daten jedoch für alle untersuchten Embryonen vergleichbar sind (siehe Standardabweichungen in Abb. 3.22b), werden die Daten als zuverlässig eingeordnet. Eine Begründung für die Unabhängigkeit von der Zellgröße kann hier nicht gegeben werden. Wie bereits erwähnt wurde, lieferten Turlier *et al.* bereits eine mögliche Erklärung für die Dauer der Cytokinese, wobei die Unabhängigkeit von der Zellgröße eine Folge der Aktomyosindynamik ist [223]. Ähnliche mechanische oder biochemische Erklärungsansätze sind für alle einzelnen Teilschritte der Mitose (Chromosomenkondensation, Spindelaufbau, Spindelseparation etc.) nötig, so dass dies den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigen würde. Zumindest für die Dauer der Separation der Spindelhälften

kann jedoch das in Kap. 3.3 entwickelte Modell zur Spindelverschiebung einen Ansatz liefern: Die Dauer der Spindelverschiebung ist darin zellgrößenunabhängig. Die Mitosedauern sind in Keimbahnzellen etwas länger als in somatischen. Dies kann z.B. durch das Vorhandensein eines *DNA-replication checkpoint* in den Keimbahnzellen erklärt werden (siehe Einleitung, Kap. 3.5.1) [213].

Weiterhin wurde gezeigt, dass die gesamten Zellzyklendauern quantitativ durch zwei Phasen beschrieben werden können, wobei die Dauer der ersten Phase vom Zellvolumen abhängt, die der zweiten jedoch konstant ist (Gl. 3.22). Der volumenabhängige Anteil, α/V_{zelle} , wird dabei hauptsächlich als Dauer der Interphase, der volumenunabhängige Teil τ_M als Dauer der Mitose interpretiert. Als Rechtfertigung hierfür wurden zum einen die Ergebnisse bezüglich τ_{P-A} angeführt, siehe oben. Zum anderen stimmt die Temperaturskalierung von τ_M mit der von τ_{P-A} überein. Ein Abschnitt der Interphase könnte jedoch ebenso zum volumenunabhängigen τ_M beitragen; eine experimentelle Unterscheidung ist hier nicht ohne Weiteres möglich.

Die Daten mussten für die Analyse in die jeweiligen Zelllinien aufgeteilt werden, d.h., das Verhalten ist nicht für alle Zellen gleich. Dies stimmt mit den Beobachtungen in zwei anderen quantitativen Untersuchungen der Zellzyklendauern in *C. elegans* überein [107, 214], auf die bereits in der Einleitung dieses Kapitels eingegangen wurde (Kap. 3.5.1). Von Arata *et al.* wurde, ebenso wie in dieser Arbeit, der Einfluss des Zellvolumens auf die Zellzyklendauer untersucht [107]. Die Analyse erfolgte bis zur siebten Generation der AB-Linie und korrespondierenden Stadien anderer Zelllinien. Dort auftretende Probleme bei der Bestimmung der Zellvolumina wurden bereits in Kap. 2.2.2 diskutiert. Auch in dieser Studie treten signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien zutage. Weiterhin wird in [107] von einer volumenunabhängigen Dauer der Mitose berichtet (zu methodischen Problemen hierzu siehe Kap. 3.5.1), die gesamten Zellzyklendauern werden dann jedoch durch Potenzgesetze ohne konstanten Term beschrieben ($\tau_{CCD} = aV_{zelle}^b$, $b < 1$). Hier entsteht somit ein Widerspruch zu ihren eigenen, aber auch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine generelle Erklärung für das beobachtete Verhalten kann in der Studie zudem nicht gegeben werden. Dass die Daten von Arata *et al.* vor allem für kleine Zellvolumina durch Potenzgesetze dennoch relativ gut beschrieben werden können lässt sich allerdings mit den Ergebnissen dieser Arbeit begründen. In Stadien nach dem Beginn der Gastrulation treten, wie hier gezeigt, deutliche Abweichungen vom durch Gl. 3.22 vorhergesagten Verlauf auf. Dies führt dazu, dass die Zellzyklendauern nach der Gastrulation effektiv einen Verlauf gemäß einem Potenzgesetz zeigen (vgl. hierzu Abb. 3.29). Größere Abweichungen ergeben sich demnach nur für die ersten Zellgenerationen, in welchen die Dauer der M-Phase, τ_M , der dominante Beitrag zur Zellzyklendauer ist. Die Abweichungen zwischen Messdaten und Fitkurve sind in [107] dort tatsächlich am größten.

Von Bao *et al.* wurden die Zellzyklendauern für die ersten acht Zellgenerationen bestimmt, allerdings ohne Kenntnis der Zellvolumina [214]. Dort wurde gezeigt, dass die Zellzyklendauern innerhalb einer Zelllinie einer geometrischen Folge gehorchen, $\frac{\tau_{CCD,g+1}}{\tau_{CCD,g}} = \frac{1}{1-k} = \text{const}$ (Zellgeneration g). Der Fitparameter $k < 1$ ist linienabhängig. Es ergibt sich ein Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da die beobachtete Skalierung der Zellzyklendauern mit den Zellvolumina nicht zu der angesprochenen geometrischen Folge führt. Dieser Widerspruch kann hier nicht befriedigend aufgeklärt werden.

Diskussion des Modells limitierender Komponenten. Die Skalierung der Dauer der Interphase mit dem Zellvolumen wurde in dieser Arbeit über ein Modell limitierender Komponenten erklärt. Dieses Modell ist das erste, dass die Zellzyklendauern, ausgehend von einem molekularen Niveau, beschreibt und mit Randbedingungen (in diesem Fall Zellvo-

lumen) in Verbindung bringt. Die Rolle der limitierenden Komponenten übernehmen in dem Modell die Kernporen, deren Anzahl pro Zelle sich mit jeder Zellteilung reduziert. Es soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten die Richtigkeit des Modells nicht überprüft werden kann. Die Rolle der limitierenden Komponente könnte somit auch von anderen Proteinen übernommen werden, die in dem konkret entwickelten Modell nicht vorkommen müssen.

Daher seien hier verschiedene experimentelle Möglichkeiten genannt, mit welchen das Modell überprüft werden kann. Eine naheliegende Möglichkeit ist die partielle Reduktion der Funktionalität der NPCs. Dies entspricht einer Reduktion von γ und/oder N_0 in Gl. 3.31. Hierdurch sollten sich verlängerte Interphasen ergeben. Dieses Experiment wurde bereits von Joseph-Strauss *et al.* durchgeführt [228], wobei in der Tat ein verspäteter Eintritt in die M -Phase beobachtet wurde. Hier stimmen somit Vorhersage und Ergebnis überein. Ein weiterer möglicher Test ist die experimentelle Ausschaltung der P-Granulen. Diese wurden im Modell hauptsächlich für den signifikanten Unterschied der α -Werte zwischen Keimbahn und somatischen Linien verantwortlich gemacht (neben Transkription und asymmetrischer Verteilung der MPFs). Werden nun die P-Granulen in der Keimbahn ausgeschaltet oder liegen auf alle Zellen gleichverteilt vor, so sollten sich somatische und Keimbahn-Werte für α angleichen. Dieser Test war jedoch nicht durchführbar. Eine entsprechende, beim CGC angebotene Linie ist JH2843 [26] (das Gen *pptr-1* ist dort gelöscht, [229]). Dort liegen die P-Granulen gleichverteilt auf alle Zellen vor. Diese Linie konnte jedoch aufgrund eines uneindeutigen Phänotyps nicht geliefert werden. Messungen an zwei Ersatzlinien lieferten wenig aufschlussreiche Ergebnisse. Die verwendeten Linien sind JH3155 und JH3156 [230]. Bei beiden ist das Gen *pptr-1* gelöscht, allerdings auch *meg-1* bzw. *meg-3*. Dort sind P-Granulen vorhanden und befinden sich hauptsächlich in Keimbahnzellen. Die beobachteten Zellzyklendauern steigen um einen Faktor (2 - 3) gegenüber ungestörten Embryonen. Zwar erscheint der Anstieg für Keimbahnzellen weniger drastisch als für somatische. Dies könnte somit bedeuten, dass sich die α -Werte entsprechend der Vorhersage annähern, und dieser Effekt von einer generellen Verlangsamung aller Prozesse begleitet ist. Diese Beobachtung wurde jedoch als nicht signifikant genug klassifiziert und wird daher nicht weiter verwendet (Daten nicht gezeigt). Weitere mögliche Experimente zur partiellen Verifizierung des Modells umfassen eine Reduktion der MPFs oder eine Ausschaltung der Transkription. Hierdurch wird jedoch nicht die Bedeutung der NPCs selbst getestet, so dass durch den Ausgang des Experimentes nicht notwendigerweise auf die Validität des konkreten Modells geschlossen werden kann.

Das Modell in seiner ursprünglichen Form verliert seine Gültigkeit, sobald die Transkription nicht mehr vernachlässigbar ist. Dies ist bei Zeitpunkten nach der Gastrulation der Fall. Dort ergeben sich, wie hier auch experimentell gezeigt wurde, deutliche Abweichungen der Zellzyklendauern von den Vorhersagen. Durch die Annahme einer linear mit der Zeit ansteigenden Anzahl der limitierenden Komponenten können auch spätere Zellzyklendauern quantitativ gut wiedergegeben werden. Insgesamt können somit die Zyklendauern der ersten acht von maximal zehn Zellgenerationen (in der AB -Linie) erfasst werden. Für spätere Generationen liegen keine Daten vor, d.h., über die Gültigkeit des Modells kann hier keine Aussage getroffen werden.

Das Modell stellt, ähnlich wie das in Kap. 3.3 entwickelte Modell zur Spindelverschiebung, eine starke Vereinfachung dar. Die gesamte Zeitskala wird darin alleinig durch den Transport der MPFs durch die Kernporen bestimmt. Viele weitere nötige Prozesse (Bildung und Aktivierung der MPFs, cytoplasmischer Transport der MPFs, Wirkung der MPFs im Kern) werden vollständig vernachlässigt. Es ist somit wieder als erste Version anzuse-

hen, welche mit wachsenden Erkenntnissen als Basis zur Weiterentwicklung dienen kann (vgl. Kap. 3.3).

Trotzdem können mit dem Modell einige Beobachtungen anderer Forschungsgruppen erklärt werden. Die Schwankungen der Entwicklungsgeschwindigkeiten zwischen Embryonen [214] lassen sich zwanglos begründen. Bei der Oogenese werden mit Sicherheit Fluktuationen in den Konzentrationen der MPFs und der NPCs auftreten, so dass die Werte c_0 und N_0 ebenso fluktuieren. Hieraus folgen sofort unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten: Alle Zellzyklendauern eines Embryos werden mit dem gleichen Faktor moduliert. Schierenberg *et al.* beobachteten, dass der Ploidiegrad Einfluss auf die Zellzyklendauern hat. Haploide Zellen teilen sich vor, polyploide Zellen nach ungestörten diploiden Zellen [41]. Im Modell wird die Mitose eingeleitet, sobald sich eine kritische Anzahl n_c der MPFs im Kern befindet. n_c wiederum hängt von der DNA-Menge ab. Somit ist die Abhängigkeit der Zyklendauern vom Ploidiegrad im Modell enthalten. Weiterhin beobachteten Schierenberg *et al.*, dass bei unterbundener Cytokinese in einer Zelle mit immer mehr Zellkernen synchronisierte Mitosen auftreten, wobei die auftretenden Zyklendauern zwischen jenen ungestörter *AB*- und *P*-Zellen liegen. Außerdem gleichen sich die Skalierungen der *AB*- und *P*-Linie an, wenn einer Zelle etwas Cytoplasma der jeweils anderen Linie hinzugefügt wird (siehe Einleitung, Kap. 3.5.1). Beide Beobachtungen sind mit dem Modell erklärbar, da sich die biochemischen Zusammensetzungen der Zellen angleichen.

Es treten jedoch auch Widersprüche zwischen Vorhersagen des Modells und experimentellen Beobachtungen auf, die hier nicht aufgelöst werden können. So ist eine periodische, Cytokinese-artige Kontraktion des Kortex nach Entfernung des Zellkerns [41] mit dem Modell nicht in Einklang zu bringen. Weiterhin sollte die Zugabe von etwas Cytoplasma zu einer Zelle von einer liniengleichen anderen Zelle die Zellzyklendauern nicht beeinflussen (die Konzentration c_0 wird hierbei nicht geändert). Beide genannten Effekte wurden jedoch beobachtet [41].

Zuletzt soll auch hier auf die aus den RNAi-Daten folgenden Konsequenzen eingegangen werden (vgl. Kap. 3.4.3). Bei gentechnisch vergrößerten oder verkleinerten Zellen (C27D9.1 (RNAi) bzw. *ima-3* (RNAi)) wurde ein Einfluss auf die beobachteten Zellzyklendauern festgestellt. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass das Zellvolumen kausalen Einfluss auf die Zellzyklendauern hat. Innerhalb des Modells wird das Zellvolumen als bestimmend für die Anzahl der NPCs angenommen. Zusammen mit den Ergebnissen der RNAi-Experimente legt dies wie schon bei den Zellkerngrößen (Kap. 3.4) den Schluss nahe, dass bei der Oogenese die Konzentration anstelle der Anzahl der konstituierenden Proteine festgelegt wird.

3.6. Generalisierung des Modells zur Zellanordnung

Dieses Kapitel behandelt die Generalisierung des Modells zur Zellanordnung im Vergleich zu der in Kap. 1.1.4 behandelten Version. Nach einer kurzen Einleitung werden die während dieser Arbeit erzielten Fortschritte dargelegt. Zudem erlauben diese eine Analyse des Einflusses asymmetrischer Zellteilungen sowie der Zellzyklendauern auf die Stabilität der Zellanordnung. Das Kapitel wird mit einer Diskussion der Ergebnisse abgeschlossen.

Auszüge dieses Kapitels wurden 2016 in *Physical Review Letters* publiziert [195].

3.6.1. Einleitung

In Kap. 1.1.4 wurde bereits detailliert auf das Modell zur Zellanordnung eingegangen. Dieses wurde in seiner ursprünglichen Form während der Diplomarbeit des Autors entwi-

ckelt und war 2013 Gegenstand einer Veröffentlichung im *Biophysical Journal* [2]. Obwohl mit dem Modell die experimentell beobachteten Zellanordnungen bis zum zwölfzelligen Zustand präzise reproduziert werden können, weist es einige bedeutende Schwächen auf, die eine Weiterentwicklung bzw. Generalisierung erstrebenswert machen.

So ist die Beschränkung des simulierten Bereiches auf $n \leq 12$ Zellen nicht biologisch begründet, sondern eine Folge damaliger experimenteller Limitierungen. Die Bildqualität des SPIM war zu dieser Zeit signifikant schlechter als heute (geringerer Kontrast, geringere Schärfe, höheres Bleichen als Folge des damals einfacheren Setups). Zudem war weder der Trackingalgorithmus noch die Auswertungsroutine (vgl. Kap. 2.2.1) weit entwickelt. Insgesamt hatte dies zur Folge, dass das Tracking für mehr als etwa 15 Zellen nicht stabil war. Zudem konnten die Teilungsachsen nicht hinreichend präzise aus dem Tracking ausgelesen werden und mussten somit geschätzt werden [1]. Dies ist nur für frühe Entwicklungsstadien möglich.

Ein erstes Ziel dieses Kapitels ist daher die Erweiterung des von dem Modell/der Simulation abgedeckten Bereiches auf Zustände mit $n \leq 24$ Zellen, d.h. bis kurz vor Einsetzen der Gastrulation. Dort besteht eine tatsächlich biologische Grenze, ab welcher das Modell mit isotropen Kräften seine Gültigkeit verliert. Während der Gastrulation (ab dem 26-zelligen Zustand) treten bekanntermaßen erste "aktive" Zellbewegungen auf. Die Zellen *Ea* und *Ep* migrieren hierbei als erstes in den Innenraum. Treibende Kraft hinter dieser Bewegung ist die sog. *apical constriction*, ein aktives, myosingetriebenes Zusammenziehen der dem Außenraum zugewandten (apikalen) Plasmamembranen [51]. Als Folge dieses Zusammenziehens werden beide Zellen in den Innenraum gedrängt. Diese Bewegung kann durch die isotropen Kräfte F_C und F_W in dem Modell nicht beschrieben werden (siehe auch Kap. 4.2).

Neben der Beschränkung auf Zustände mit nur wenigen Zellen weist das Modell in seiner damaligen Form ein weiteres Problem auf. Es ist stark von direkten experimentellen Eingabeparametern abhängig. Als direkte Parameter werden hier solche bezeichnet, die einen experimentell durch Tracking oder Segmentierung beobachtbaren Vorgang explizit beschreiben (so fallen z.B. die Kraftamplituden $F_{W,0}$ und $F_{C,0}$ nicht unter diese Definition). Für jede einzelne Zellteilung werden drei direkte Parameter benötigt: der Zeitpunkt der Teilung, die Teilungsachse sowie das Verhältnis der Tochterzellvolumina. Um die Zellanordnung bis zum 24-zelligen Zustand zu beschreiben, werden in der ursprünglichen Version des Modells mindestens 69 direkte Parameter benötigt.

Das zweite Ziel dieses Kapitels ist daher die Reduktion der erforderlichen direkten Eingabeparameter. Dies ist anhand der Ergebnisse von Kap. 3.3 und Kap. 3.5 möglich. So können die Tochterzellvolumina mit den zellgrößenunabhängigen Spindelverschiebungen in den Keimbahnzellen bzw. deren Fehlen in somatischen Zellen abgeschätzt werden. Aus den sich ergebenden Zellvolumina können sodann die Teilungszeiten der jeweiligen Zellen berechnet werden. Als einzige direkte Parameter verbleiben damit die Zellteilungsachsen, die Gegenstand zukünftiger Projekte sein werden (vgl. Kap. 4.2). Anhand des weiterentwickelten Modells kann daraufhin auch die Stabilität der Zellanordnung bzgl. der Ergebnisse von Kap. 3.3 und Kap. 3.5 untersucht werden.

3.6.2. Ergebnisse

Es wird zuerst auf Änderungen in der Implementierung der Simulation eingegangen. Danach wird gezeigt, dass damit die Zellanordnung bis kurz vor Einsetzen der Gastrulation stabil reproduziert werden kann. Dies ist auch dann möglich, wenn die Anzahl der Parameter weiter reduziert wird. Anschließend erfolgt eine Stabilitätsanalyse der verwendeten Parameter zur Beschreibung der Teilungsasymmetrie sowie der Teilungszeiten. Es zeigt

sich, dass vor allem die verzögerten Teilungen der Keimbahnzellen Einfluss auf die Stabilität der Zellanordnung haben.

Weiterentwicklungen an der Implementierung

An dieser Stelle wird nur auf relevante konzeptuelle und methodische Änderungen an der Simulation im Vergleich zu dem in Kap. 1.1.4 geschilderten Vorgehen eingegangen. Eine detaillierte Darstellung des Ablaufes der Simulation findet sich im Anhang (Kap. A.3). In Abb. 3.30 sind die Änderungen schematisch dargestellt. Dort finden sich für beide Versionen der Simulation, d.h. der während der Diplomarbeit der Autors 2012/2013 entwickelten sowie der aktuellen, Ablaufdiagramme, welche die Vorgänge übersichtlich gegenüberstellen.

Die Positionsiteration der Zellen bleibt unverändert. Die Langevin-Gleichung Gl. 1.1 sowie die Kräfte F_W (Gl. 1.2) und F_C (Gl. 1.3) gelten weiterhin in der genannten Form.

Sämtliche Änderungen betreffen damit nur die Handhabung der Zellteilungen bzw. der die Zellteilungen regulierenden Parameter. Zellteilungen werden in dem Modell als ein instantanes Ereignis behandelt. Zum Zeitpunkt der Teilung wird eine Zelle (d.h. ein Massenpunkt) durch ihre beiden Tochterzellen ersetzt, wobei diese mit einem kleinen Abstand d voneinander entlang der Teilungsachse initialisiert werden ($d = 0,25 \mu\text{m}$ in allen Simulationen). Dabei müssen ihnen auch ihre Volumen und Teilungszeitpunkte zugewiesen werden.

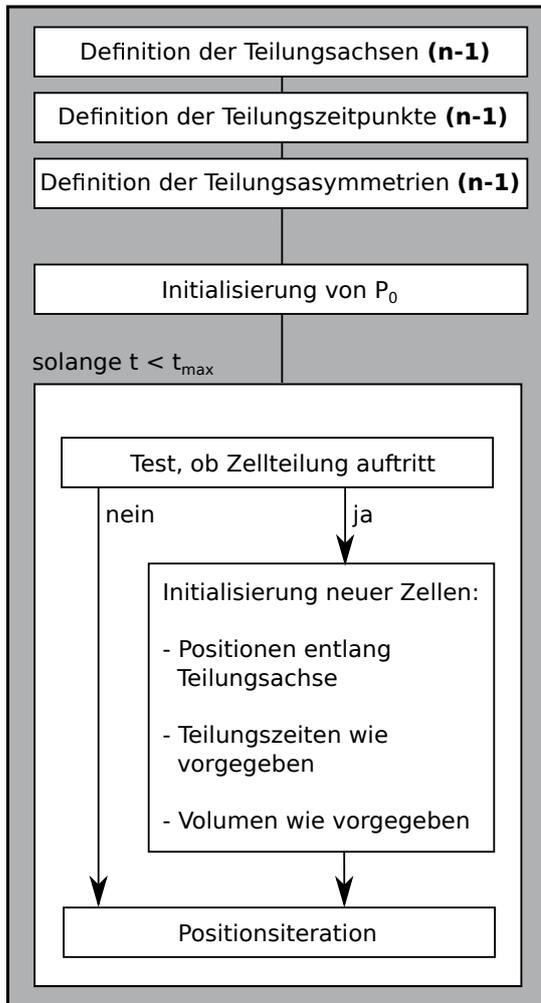
In der alten Version des Modells wurden vor Beginn der Simulation *alle* auftretenden Zellteilungsachsen, Teilungszeitpunkte und -asymmetrien in einer Lookup-Tabelle festgelegt, deren Einträge zuvor experimentell ermittelt wurden. Während der Simulation wurden die Werte dieser Lookup-Tabellen nur noch abgefragt, um neue Zellen zu initialisieren (vgl. Kap. 1.1.4). Somit werden $3 \cdot (n-1)$ dieser direkten Parameter in den Lookup-Tabellen benötigt, wenn die Zellanordnung vom ein- bis zum n -zelligen Zustand simuliert werden soll.

In der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Version der Simulation ist dies fundamental anders. Die Lookup-Tabellen für die Teilungsasymmetrien und -zeitpunkte entfallen, womit nur noch diejenige für die Teilungsachsen verbleibt. Die Änderungen, die diese Parameterreduktion ermöglichen, werden im Folgenden besprochen:

Bestimmung der Zellvolumina. Zur Berechnung aller in der Simulation auftretenden Zellvolumen sind zwei Parameter nötig. Diese sind die Spindelverschiebung in der Zygote sowie die aller weiteren Keimbahnzellen (siehe unten). Des Weiteren muss nicht definiert werden, ob eine Teilung symmetrisch oder asymmetrisch verläuft; es sind also insbesondere keine Indikator-Parameter nötig. Der Abstammungsbaum (Abb. 1.5a) aller simulierten Zellen ist jedoch vorgegeben.

Die Reduktion auf zwei Parameter ist mit dem folgenden Schema möglich: Standardmäßig teilen sich im Modell *alle* Zellen asymmetrisch, außer sie sind als größere Zelle aus einer asymmetrischen Zellteilung hervorgegangen. In diesem Fall verlieren sie und alle ihre Töchter die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung (hierdurch entfällt - bei gegebenem Abstammungsbaum - die Notwendigkeit von Indikator-Parametern, siehe oben). Die Zygote P_0 teilt sich somit standardmäßig asymmetrisch. Die kleinere Tochterzelle P_1 behält die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung, während die größere Tochterzelle AB - und damit die gesamte AB -Linie - diese verliert. Nach der erneut asymmetrischen Teilung von P_1 hat die größere Tochter EMS die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung verloren, während die kleinere Tochter P_2 sich erneut ungleich teilt, *et cetera*. Insgesamt führt dieses Schema dazu, dass sich alle Keimbahnzellen asymmetrisch, alle somatischen Zellen hingegen symmetrisch teilen, ohne dass dies von Beginn an vorgegeben ist. Dies entspricht den

(a) Stand 2013



(b) Stand 2018

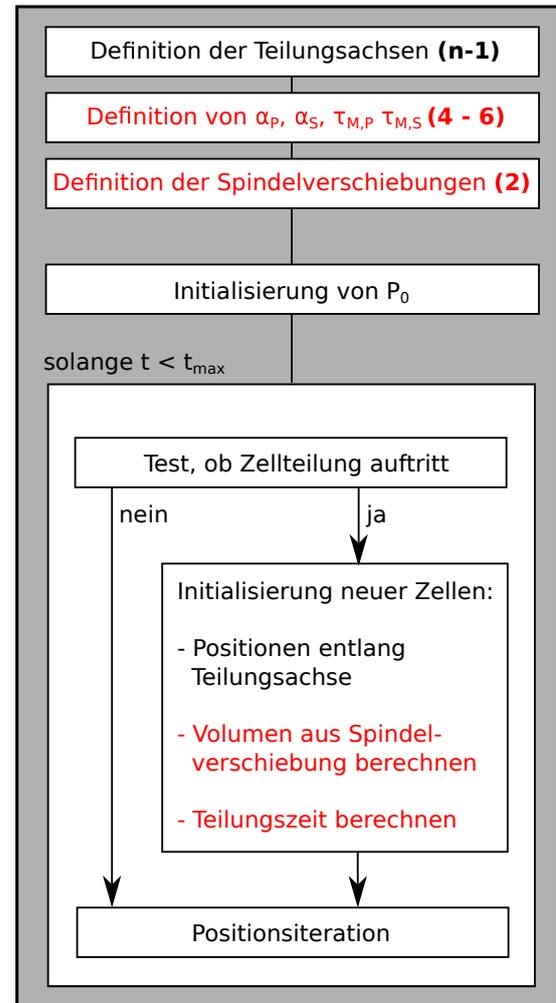


Abbildung 3.30.: Ablaufdiagramme der Simulation zur Zellanordnung. (a) Die in der Diplomarbeit des Autors entwickelte Simulation der Zellanordnung zeichnet sich dadurch aus, dass alle Zellteilungsachsen, -zeitpunkte und -asymmetrien per Lookup-Tabelle vor Beginn der Positionsiteration der Zellen festgelegt werden. Für eine Simulation vom einzelligen bis zum n -zelligen Zustand sind somit $3(n - 1)$ direkte Parameter nötig (Definition siehe Text). (b) In der aktuellen Version der Simulation ist die Anzahl direkter Parameter auf $n - 1$ reduziert. Nur die Teilungsachsen müssen noch per Lookup-Tabelle festgelegt werden. Die Reduktion ist durch die Verwendung der Ergebnisse von Kap. 3.3 und Kap. 3.5 möglich. Die Zellvolumina und -teilungszeiten werden während der Positionsiteration dynamisch berechnet (die Anzahl der nötigen Parameter ist in Klammer angegeben). Die Positionsiteration selbst hat sich nicht geändert.

Ergebnissen aus Kap. 3.3. Dort wurde festgestellt, dass Asymmetrien der Keimbahnzellen intern bestimmt sind, während solche in somatischen Zellen erstens selten und zweitens wahrscheinlich nur eine Folge sterischer Randbedingungen sind. Die besonders asymmetrischen Teilungen der somatischen Zellen MSa , MSp , Ca und Cp erfolgen erst im oder nach dem 24-zelligen Zustand und sind daher nicht Gegenstand der aktuellen Simulation.

Die einzigen benötigten Parameter sind somit die in Kap. 3.3 eingeführten Spindelverschiebungen Δx . Wie dort gezeigt wurde, ist die Spindelverschiebung in der postzygotischen Keimbahn konstant mit $\Delta x \approx 1,75 \mu\text{m}$. In der Zygote wurde eine Spindelverschiebung von $\Delta x \approx 3 \mu\text{m}$ beobachtet. Mit den Δx können die Volumina durch den bereits eingeführten Ansatz der Kugelsegmente bestimmt werden. Die Volumina der Tochterzellen ergeben sich anhand der beiden Gleichungen

$$V_1 = \frac{\pi}{3}(R + \Delta x)^2(2R - \Delta x) \quad (3.36)$$

für die größere und

$$V_2 = \frac{\pi}{3}(R - \Delta x)^2(2R + \Delta x) \quad (3.37)$$

für die kleinere Tochterzelle (vgl. Gl. 3.9 & Gl. 3.10). Dabei ist R der zum Volumen V gehörige Radius der sich teilenden Mutterzelle. Die Zuordnung von $V_{1/2}$ auf die Zellidentitäten erfolgt anhand des vorgegebenen Abstammungsbaums aller Zellen. Für die Spindelverschiebungen gilt des Weiteren

$$\Delta x = \begin{cases} 2,35 \mu\text{m} + \zeta & \text{falls } P_0 \text{ teilt,} \\ 1,75 \mu\text{m} + \zeta & \text{falls sonstige asymmetrische Teilung,} \\ \zeta & \text{sonst.} \end{cases} \quad (3.38)$$

Der additive, normalverteilte Rauschterm ζ mit $\langle \zeta \rangle = 0$ und $\sigma_\zeta = 150 \text{ nm}$ induziert Fluktuationen in den Zellvolumina. Seine Standardabweichung ist willkürlich gewählt (siehe auch nächstes Unterkapitel). Die Abweichung zwischen dem hier verwendeten $\Delta x \approx 2,35 \mu\text{m}$ und dem oben genannten Wert für die Spindelverschiebung in der Zygote ergibt sich durch die Zellformen: Bei der Ableitung von Gl. 3.36 und Gl. 3.37 wird explizit von sphärischen Zellen ausgegangen, während die Zygote tatsächlich ellipsoid ist. Um durch eine Spindelverschiebung in einer Kugel dasselbe Teilungsverhältnis zu erhalten wie das in der Zygote gemessene, ist $\Delta x \approx 2,35 \mu\text{m}$ nötig.

Eine Validierung dieses Vorgehens findet im nächsten Unterkapitel statt.

Bestimmung der Zellzyklendauer. In der frühen Version des Modells musste der Teilungszeitpunkt für jede einzelne Zelle als absolute Zeit vorgegeben werden. Dies kann nun aufgrund der Ergebnisse von Kap. 3.5 ersetzt werden. Eine Zelle teile sich zur Zeit t in ihre beiden Töchter, deren Volumina $V_{1/2}$ gemäß obigem Schema berechnet werden. Dann teilen sich diese neuen Zellen nach Gl. 3.22 zu den Zeiten

$$t_1 = t + \frac{\alpha_1}{V_1} + \tau_{M,1} \quad \text{und} \quad t_2 = t + \frac{\alpha_2}{V_2} + \tau_{M,2}. \quad (3.39)$$

Für $\alpha_{1/2}$ und $\tau_{M,1/2}$ müssen die linienabhängigen Parameter verwendet werden (vgl. Tabelle 3.1). Somit können die $n-1$ direkten Parameter der Zellteilungszeiten durch maximal sechs Fitparameter (vier α sowie zwei τ_M) ersetzt werden. Eine Diskussion der Parameter erfolgt im nächsten Unterkapitel.

Bestimmung der Zellteilungsachsen. Die Handhabung der Teilungsachsen in der Simulation hat sich im Vergleich zur alten Version nicht geändert. Die Achsen müssen immer noch über eine Lookup-Tabelle definiert werden.

Während sie früher anhand der Aufnahmen geschätzt wurden, erfolgt deren Bestimmung nun allerdings anhand der Trackingergebnisse. Hierzu wird der in Kap. 3.1.2 eingeführte gemittelte Trajektoriensatz verwendet (dort sind die Zellkerntrajektorien über insgesamt $n = 8$ Embryonen gemittelt, um individuelle Fluktuationen und Messfehler zu minimieren). Die Bestimmung der Zellteilungsachsen \mathbf{d} anhand dieses Trajektoriensatzes erfolgt nach der in Kap. 3.3 eingeführten Methode, die dort zur Bestimmung der Spindelverschiebungen verwendet wurde (siehe Gl. 3.7). Die verwendeten Werte sind im Anhang in Tabelle A.2 angegeben.

Reproduktion der Zellanordnungen bis zur Gastrulation

Waren gemäß dem Vorgehen des alten Modells 69 direkte Parameter nötig, um die Zellanordnung bis zum 24-zelligen Zustand zu simulieren, so sind dies im aktuellen Modell nur noch 23 direkte und acht indirekte (Fitparameter Δx , α , τ_M). Das entspricht einer Reduktion um 66 % (direkte Parameter) bzw. 58 % insgesamt.

Zuerst soll nun geprüft werden, ob mit dem beschriebenen Vorgehen die Zellanordnung tatsächlich bis zum Einsetzen der Gastrulation beschrieben werden kann. Die Simulationen laufen dabei generell bis 300 s nach Eintritt in den 24-zelligen Zustand. Selbst wenn dort laut Gl. 3.39 weitere Zellteilungen auftreten sollten, werden sie nicht mehr ausgeführt. Aufgrund des Rauschens der Spindelverschiebung und der Kopplung an die Teilungszeiten sind die Gesamtlaufzeiten leicht unterschiedlich. Die Spindelverschiebungen werden gemäß Gl. 3.38 berechnet. Zur Berechnung der Zellteilungszeiten werden die Fitparameter aus Tabelle 3.1 verwendet ($\alpha_P = 23\,035 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^3$, $\alpha_{AB} = 10\,326 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^3$, $\alpha_{MS} = 12\,423 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^3$, $\alpha_C = 15\,582 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^3$, $\tau_{M,P} = 16,94 \text{ min}$ für Keimbahnzellen & $\tau_{M,S} = 15,55 \text{ min}$ für somatische Zellen aller Linien). Da für die E -Linie kein α -Wert bestimmt werden kann (vgl. Kap. 3.5.2), wird für die Berechnung der Teilungszeit der Zelle E der Wert α_{MS} verwendet. Zur Begründung wird angeführt, dass die Zellzyklendauern von MS und E ähnlich und außerdem E und MS Schwesterzellen sind. Die Zeitauflösung der Simulation wurde gegenüber der alten Version von $\Delta t = 5 \text{ s}$ auf $\Delta t = 2 \text{ s}$ erhöht, um Diskretisierungsfehler klein zu halten. Diese können vor allem bei steigenden Zellanzahlen eine Rolle spielen. Alle weiteren Parameter, die die Zellbewegung oder die Randbedingungen betreffen (siehe Tabelle 1.2), wurden nicht geändert. Es werden insgesamt 500 Simulationsläufe berechnet.

In einem ersten Schritt wird geprüft, ob die mittels der oben dargelegten Relationen berechneten Zellvolumen und -zyklendauern korrekt wiedergegeben werden. Zwar wurde die Übereinstimmung in den Kapiteln 3.3 und 3.5 jeweils für einzelne Zellen gezeigt. In der Simulation könnten sich Fehler allerdings durch wiederholte Anwendung akkumulieren und so zu immer größeren Abweichungen führen.

In Abb. 3.31a sind die über alle 500 Simulationsläufe gemittelten Zellvolumen V_{sim} gegen die mittleren Messwerte V_{exp} (vgl. Kap. 3.2.1) aufgetragen. Auf Fehlerbalken wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die aus dem Rauschen ζ der Spindelverschiebungen resultierenden Standardabweichungen $\sigma_{V_{sim}}$ liegen im Bereich von $50 \mu\text{m}^3$ (Daten nicht gezeigt), was in etwa von der Größenordnung experimenteller Schwankungen bei Zellen des 24-zelligen Zustandes ist (vgl. Kap. 3.2.1). Die simulierten und gemessenen Volumina zeigen weiterhin eine gute Übereinstimmung. Größere Abweichungen treten nur in der AB -Linie auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier sämtliche Asymmetrien vernachlässigt werden und somit alle Zellen einer Generation im Mittel das gleiche Vo-

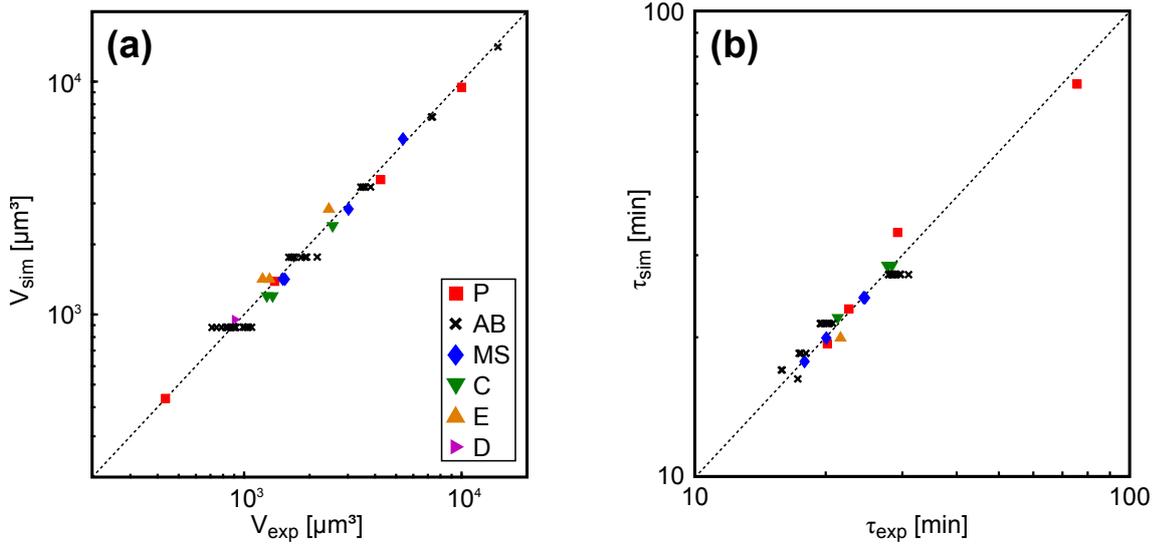


Abbildung 3.31.: Experimentelle und simulierte Zellvolumina und Zellzyklendauern. (a) Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Zellvolumina. Die verwendeten Messwerte V_{exp} sind über $n = 10$ Embryonen der Linie OD95 gemittelt (vgl. Kap. 3.2.1). Die gezeigten Simulationswerte V_{sim} sind über alle 500 berechneten Simulationsläufe gemittelt. Zur Berechnung wurden die Spindelverschiebungen gemäß Gl. 3.38 verwendet. Die mittlere Abweichung zwischen V_{exp} und V_{sim} beträgt 7,6% (berechnet gemäß Gl. 3.40). (b) Vergleich der experimentell bestimmten und simulierten Zellzyklendauern. Ebenso wie in (a) sind die verwendeten experimentellen Zellzyklendauern τ_{exp} über $n = 10$ Embryonen der Linie OD95 gemittelt (vgl. Kap. 3.5.2). τ_{sim} ist über die Ergebnisse aller 500 berechneter Simulationsläufe gemittelt. In den Simulationen wurden für α und τ_M die zelllinienabhängigen Werte aus Tabelle 3.1 verwendet. Die mittlere Abweichung zwischen τ_{exp} und τ_{sim} beträgt 5,3%. Auf Fehlerbalken wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in (a-b) verzichtet.

lumen haben. Innerhalb eines Simulationslaufes treten allerdings wegen des Rauschens ζ durchaus Unterschiede auf. Die mittleren prozentualen Abweichungen sind

$$\delta_V = \left\langle \frac{|V_{exp} - V_{sim}|}{V_{exp}} \right\rangle = 7,6\%. \quad (3.40)$$

Die simulierten Zellzyklendauern τ_{sim} sind in Abb. 3.31b gegen die experimentell bestimmten τ_{exp} aufgetragen und zeigen eine vergleichbar gute Übereinstimmung wie die Zellvolumen. Die mittlere Abweichung beträgt $\delta_\tau = 5,3\%$, wobei die Berechnung analog zu Gl. 3.40 erfolgt. Hier ist anzumerken, dass die Zellzyklendauern zur Darstellung auch für solche Zellen berechnet wurden, die sich in der Simulation nicht mehr teilen, d.h. für alle Zellen des 24-zelligen Zustandes (mit Ausnahme von D). Der Ansatzes gilt also auch über das Ende der aktuellen Simulation hinaus. Insgesamt erscheint damit die Ersetzung der direkten Parameter bezüglich Teilungsverhältnissen und Zellteilungszeiten valide.

In einem zweiten Schritt sollen nun die aus den Simulationen erhaltenen Zellanordnungen mit den experimentell beobachteten verglichen werden. Hierzu werden Korrelationskoeffizienten gemäß Gl. 2.1 verwendet (vgl. auch das Vorgehen in Kap. 3.1.2 beim Vergleich experimentell erhaltener Trajektoriensätze). Das Koordinatensystem der Simulation ist so gelegt, dass ein Vergleich mit den transformierten Trackingergebnissen direkt möglich ist (vgl. Kap. 2.2.1). Zum Vergleich wird der gemittelte Trajektoriensatz herangezogen, der in Kap. 3.1.2 eingeführt wurde. Als Argument wird auch hier angeführt, dass dort natürliche Schwankungen und Trackingfehler effektiv unterdrückt sind, und somit ein Vergleich mit dem “Soll-Zustand” erfolgt.

Die zeitabhängigen Korrelationen zwischen der mittleren experimentellen Zellanordnung und den 500 Simulationsläufen sind in Abb. 3.32a dargestellt. Die Mehrheit aller Simula-

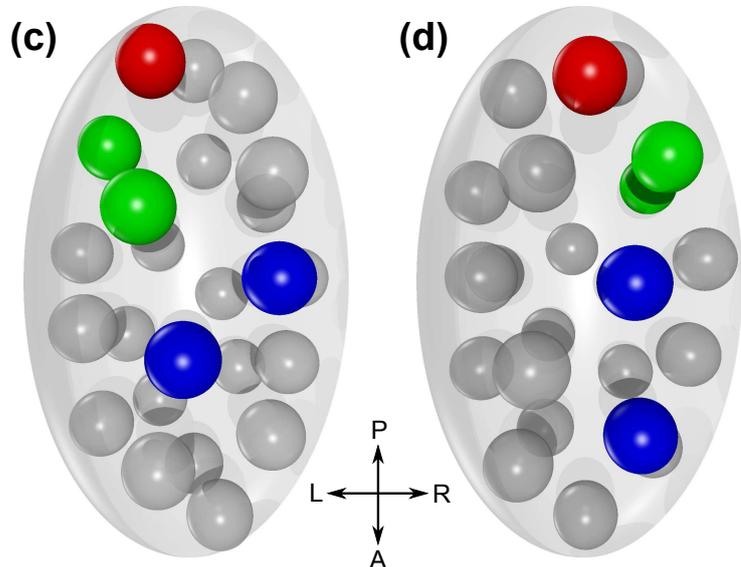
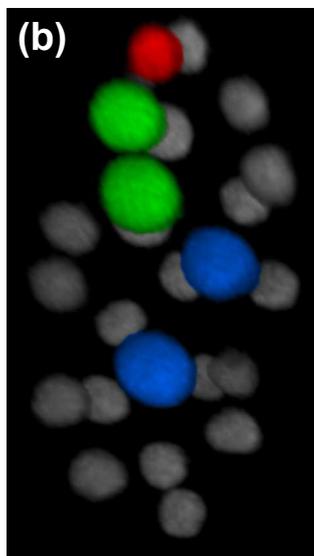
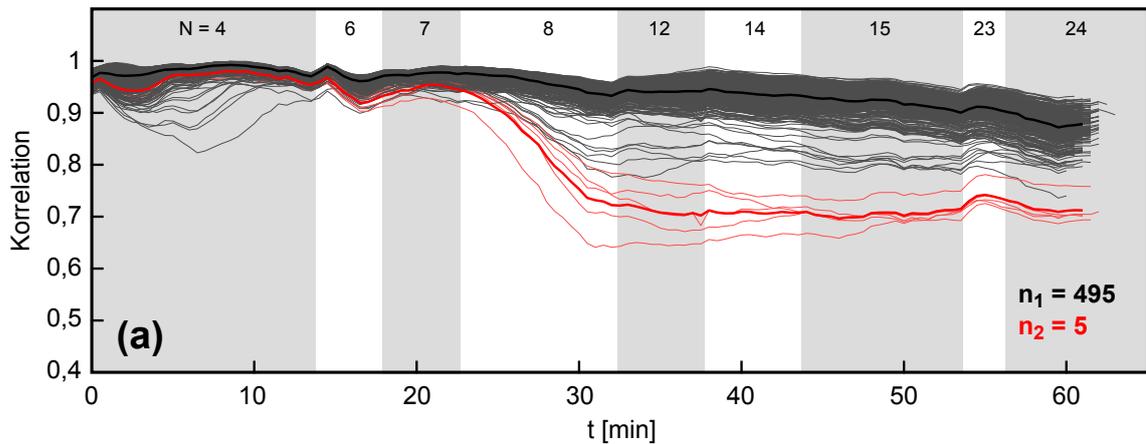


Abbildung 3.32.: Vergleich der Simulationen mit Trackingergebnissen. (a) Zeitabhängige Korrelationen gemäß Gl. 2.1 zwischen experimentell erhaltenen Zellkerntrajektorien und 500 Simulationsläufen. Bei den Simulationen wurden die korrekten Parameter für Δx , α und τ_M verwendet (Definition siehe Text). Zum Vergleich wurde ein über $n = 8$ getrackte Embryonen gemittelter Trajektoriensatz verwendet. Es ergaben sich zwei Phänotypen, *PT1* und *PT2*. $n_1 = 495$ Simulationsläufe, d.h. etwa 99%, lieferten Ergebnisse, die *PT1* zugerechnet werden (graue Linien, zum Auswahlkriterium siehe Text). Diese zeichnen sich im Wesentlichen über durchweg hohe Korrelationen, $c > 0,8$, aus. Die mittlere Korrelation von *PT1* (dicke schwarze Linie) zeigt einen Median-Wert von $\langle \bar{c} \rangle = 0,95$. $n_2 = 5$ Simulationsläufe werden *PT2* zugerechnet (rote Linien). Hier ist die Übereinstimmung mit experimentell beobachteten Zellanordnungen deutlich schlechter. Die mittlere Korrelation (dicke rote Linie) zeigt einen Median-Wert von $\langle \bar{c} \rangle = 0,74$. Die mittlere Zellanzahl N als Funktion der Zeit ist mit angegeben (siehe obere Zeile). (b) Zellanordnung am Ende des 24-zelligen Zustandes in einem realen Embryo. Gezeigt ist die Projektion einer SPIM-Aufnahme entlang der DV-Achse eines Embryos der Linie OD95 (posterior oben, anterior unten, siehe eingezeichnete Koordinatenachsen). Die Nuklei von P_4 (rot), MSa und MSp (blau) sowie Ea und Ep (grün) sind hervorgehoben. (c) Repräsentative Zellanordnung am Ende eines Simulationslaufes mit dem Ergebnis *PT1*. Orientierung des Koordinatensystems und farbige Hervorhebungen wie in (b). Zu beachten ist die Übereinstimmung der Positionen der markierten Zellkerne und weiterer Zellgruppen. (d) Repräsentative Zellanordnung am Ende eines Simulationslaufes mit dem Ergebnis *PT2*. Orientierung des Koordinatensystems und farbige Hervorhebungen wie in (b). Hier fällt auf, dass sich die Positionen der markierten Zellen deutlich von jenen in (b-c) unterscheiden.

tionsläufe weist während der gesamten simulierten Zeitdauer eine Korrelation von $c > 0,8$ auf (graue Linien in Abb. 3.32a, auf das Auswahlkriterium wird weiter unten eingegangen). Von den 500 berechneten Simulationen zeigen insgesamt $n_1 = 495$ dieses Verhalten, entsprechend einem Anteil von $p_1 = 99\%$. Die über alle diese Simulationsläufe gemittelte Korrelation $\langle c \rangle$ ist in Abb. 3.32a als dicke schwarze Linie eingezeichnet. Deren zeitlicher Medianwert beträgt $\langle \bar{c} \rangle = 0,95$, am Ende des simulierten Zeitraumes ist $\langle c \rangle_{end} = 0,88$. Sie ist damit von ähnlicher Größe wie die beim Vergleich ungestörter Embryonen erhaltene (siehe Kap. 3.1.2). Jeder dieser Simulationsläufe liefert am Ende eine Zellanordnung *PT1* (Phänotyp 1), die vergleichbar zur experimentell beobachteten ist. Dies ist in Abb. 3.32(b-c) dargestellt. Dort ist der experimentell beobachteten Anordnung eine repräsentative simulierte gegenübergestellt. Die Zellen P_4 , MSa , MSp , Ca sowie Cp sind farblich markiert.

Zudem tritt in einigen Simulationen ein anderer Phänotyp, *PT2*, auf. Die zugehörigen Korrelationen sind in Abb. 3.32a rot eingezeichnet (mittlere Korrelation: dicke rote Linie, zeitl. Median $\langle \bar{c} \rangle = 0,74$, Korrelation am Ende der Simulation $\langle c \rangle_{end} = 0,71$). *PT2* tritt insgesamt nur in $n_2 = 5$ Simulationsläufen auf, d.h. mit einer relativen Häufigkeit von $p_2 = 1\%$. Die Zellanordnung am Ende der Simulation ist bei diesem Phänotyp generell von der in Abb. 3.32d gezeigten Gestalt. Alle vier Zellen der *MS*- und *C*-Linie befinden sich hier im Gegensatz zu realen Embryonen auf der rechten Seite des Embryo. Auch für alle weiteren Zellen ergeben sich teils deutliche Abweichungen. Damit werden bei diesem Phänotypen insbesondere die Zellnachbarschaften nicht korrekt wiedergegeben. Für reale Embryonen hätte dies aufgrund somit falscher Signaltransduktionen potentiell letale Konsequenzen. Erste größere Abweichungen zwischen *PT1* und *PT2* zeigen sich gegen Ende des achtzelligen Zustandes. Auf die Gründe für die Entstehung zweier Phänotypen wird weiter unten eingegangen.

Zur automatisierten Unterscheidung der beiden Phänotypen *PT1* und *PT2* wird hier und in den folgenden Abschnitten generell das Kriterium

$$\begin{aligned} c(t = 50 \text{ min}) > 0,75 &\Rightarrow PT1 \\ c(t = 50 \text{ min}) \leq 0,75 &\Rightarrow PT2 \end{aligned} \tag{3.41}$$

verwendet. Dieses ist rein heuristisch definiert. Die Richtigkeit der Zuordnung wurde für alle Simulationen mit *PT2* als Ergebnis und stichprobenartig für die restlichen überprüft.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass das erweiterte Modell zusammen mit den Ergebnissen aus Kap. 3.3 und Kap. 3.5 (inklusive der korrekten Parameter) in der Lage ist, die Zellanordnungen bis hin zum Einsetzen der Gastrulation korrekt wiederzugeben. Die Erfolgsquote von $p_1 = 99\%$ korreliert dabei mit der Schlüpftrate realer ungestörter Embryonen von etwa $(99 - 99,5)\%$ [27]. In einem nächsten Schritt wird nun die Anzahl der verwendeten Parameter weiter reduziert.

Unterschiedliche Skalierung somatischer Linien trägt nicht zur Stabilität bei

Zur Berechnung der Zellteilungszeiten wurden in obigem Abschnitt insgesamt sechs Parameter verwendet (vier Werte für α und zwei für τ_M). In Kap. 3.5 wurde bereits darauf hingewiesen, dass der α -Wert der Keimbahn gegenüber allen somatischen Linien stark erhöht ist. Innerhalb der somatischen Linien fallen die Unterschiede hingegen geringer aus (maximal 50% zwischen der *AB*- und der *C*-Linie, Tabelle 3.1). Um zu testen, ob die leicht unterschiedlichen Skalierungen der somatischen Linien für die Stabilität der Zellanordnung wichtig sind, wird daher die Analyse des vorangegangenen Abschnittes wiederholt. Allerdings wird diesmal ein gemeinsamer α -Wert für alle somatischen Zellen verwendet.

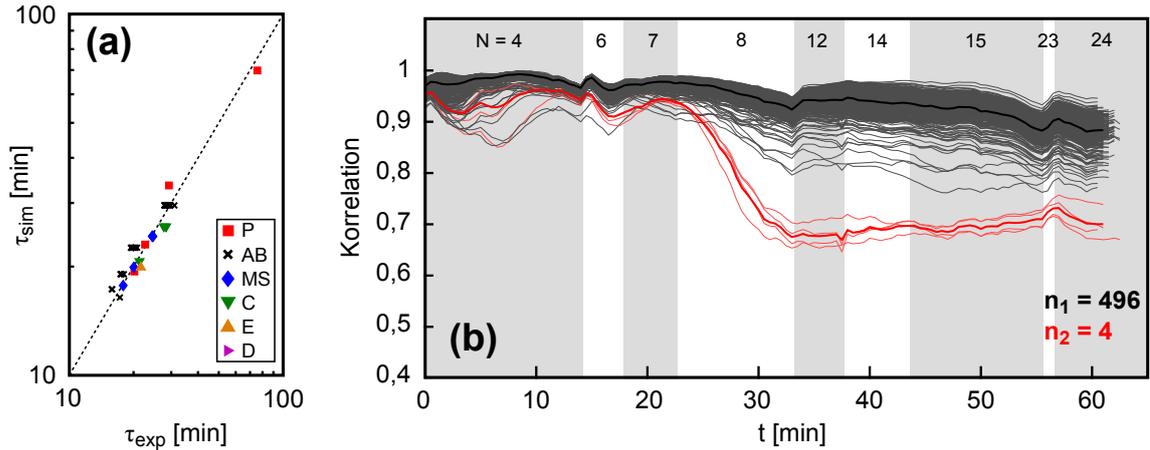


Abbildung 3.33.: Vergleich Parameter-reduzierter Simulationen mit Trackingergebnissen. (a) Wie Abb. 3.31b, allerdings wurde hier für alle somatischen Zellen ein gemeinsamer Wert $\alpha_{somatic} = 12\,339 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^3$ verwendet (zur Berechnung siehe Text). Die Gesamtzahl der Parameter, die zur Berechnung der Teilungszeiten verwendet werden, ist somit von sechs auf vier reduziert (α_P , $\alpha_{somatic}$, $\tau_{M,P}$ & $\tau_{M,S}$). Die mittlere prozentuale Abweichung steigt leicht auf 6,4%. (b) Mit dem reduzierten Parametersatz wurden 500 Simulationsläufe berechnet und die Ergebnisse korrelativ mit experimentell erhaltenen Zellkerntrajektorien verglichen. Die Darstellung folgt Abb. 3.32a. Es ergeben sich $n_1 = 496$ Simulationen mit $PT1$, $n_2 = 4$ mit $PT2$ als Ergebnis (graue bzw. rote Linien). Die Median-Werte der gemittelten Korrelationen (dicke schwarze bzw. rote Linie) sind $\langle \bar{c} \rangle = 0,95$ für $PT1$ und $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$ für $PT2$. Das Modell kann die Zellanordnung somit auch mit dem reduzierten Parametersatz korrekt wiedergeben.

Unterschiede in τ_M bleiben unverändert bestehen. Für den Fall, dass die Simulationen immer noch erfolgreich sind, wird so zudem die Anzahl der Parameter weiter reduziert.

Der in Gl. 3.39 zur Berechnung somatischer Zellteilungszeiten verwendete α -Wert wird hier als gewichteter Mittelwert berechnet. Es ist

$$\alpha_{somatic} = \frac{1}{12}(5 \cdot \alpha_{AB} + 4 \cdot \alpha_{MS} + 3 \cdot \alpha_C) = 12\,339 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^3 \quad (3.42)$$

Als Gewichte werden die Anzahlen der ausgewerteten Zellgenerationen verwendet. Dies dient dazu, den Fehler gerade für sich oft teilende Zelllinien, insbesondere die AB -Linie, klein zu halten. Aufgrund der häufigen Teilungen könnten sich hier sonst Fehler in den absoluten Zellteilungszeiten stark akkumulieren.

Mit diesem Vorgehen werden erneut 500 Simulationsläufe berechnet. An der Berechnung der Zellvolumina wird gegenüber dem vorherigen Abschnitt nichts geändert, die Änderungen betreffen nur die Berechnung der Teilungszeiten. Die Auswertung erfolgt wie oben geschildert. Die erhaltenen Zellzyklendauern τ_{sim} sind in Abb. 3.33a gegen die experimentell bestimmten τ_{exp} aufgetragen. Die Übereinstimmung ist nur unwesentlich schlechter als im vorangegangenen Abschnitt. Die mittlere prozentuale Abweichung steigt leicht auf $\delta_\tau = 6,4\%$.

Werden die erhaltenen Zellanordnungen mit den experimentellen verglichen, so ergeben sich die in Abb. 3.33b gezeigten Korrelationen. Es zeigen sich erneut zwei Populationen. $PT1$ tritt insgesamt $n_1 = 496$ mal auf, was einer relativen Häufigkeit von $p_1 = 99\%$ entspricht (mittlere Korrelation: dicke schwarze Linie in Abb. 3.33b, Median $\langle \bar{c} \rangle = 0,95$, $\langle c \rangle_{end} = 0,88$). $PT2$ tritt in $n_2 = 4$ Simulationen, d.h. mit einer Häufigkeit von $p_2 = 1\%$, auf (mittlere Korrelation: dicke rote Linie in Abb. 3.33b, Median $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$, $\langle c \rangle_{end} = 0,70$).

Es ergeben sich folglich keine signifikanten Unterschiede zum oben behandelten Fall einer Simulation mit den vollen sechs Parametern zur Bestimmung der Zellteilungszeiten.

Der Unterschied der α -Werte innerhalb somatischer Linien hat somit im Modell keinen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Zellanordnung. Zudem kann die Anzahl nötiger Parameter von sechs auf vier (α_P , $\alpha_{somatic}$, zwei τ_M) reduziert werden.

Asymmetrische Zellteilungen und verzögerte Keimbahnteilungen tragen zur Stabilität bei

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Modell in Kombination mit den korrekten Parametern Δx , α und τ_M in der Lage ist, die Zellanordnungen bis zur Gastrulation richtig zu beschreiben. Hier wird nun der Einfluss dieser Parameter auf die Stabilität der Zellanordnungen untersucht. Zu diesem Zweck werden für drei Konditionen jeweils 500 Simulationsläufe durchgeführt. Die verwendeten Konditionen sind:

1. Keine geometrischen Asymmetrien bei Zellteilungen. Es wird für alle Zellen $\Delta x = 0 \mu\text{m} + \zeta$ gesetzt. Für alle Zellen werden die korrekten jeweiligen α - und τ_M -Werte verwendet.
2. Keine linienspezifischen α - und τ_M Werte. Für alle Zellen werden die Werte der *AB*-Linie verwendet (siehe unten). Die geometrischen Asymmetrien der Zellteilungen werden wie im ungestörten Fall behandelt.
3. Es treten weder asymmetrische Teilungen auf ($\Delta x = 0 \mu\text{m} + \zeta$ für alle Zellen), noch werden linienspezifische α - und τ_M -Werte verwendet.

Mit den ersten beiden Konditionen kann getrennt voneinander getestet werden, welchen Einfluss asymmetrische Zellteilungen sowie linienspezifische Zellzyklendauern auf die Zellanordnung haben. Kondition 3 stellt eine Kombination der beiden anderen dar. Da sowohl asymmetrische Zellteilungen, als auch linienspezifisches Verhalten der Teilungszeiten letztendlich auf das PAR-System zurückgeführt werden kann (vgl. Kap. 3.3 & Kap. 3.5), sind beide Effekte in realen Embryonen nicht voneinander unabhängig. Wird die Funktion des PAR-Systems experimentell unterbunden, sollten daher weder asymmetrische Zellteilungen noch unterschiedliche Skalierungen bei den Zellzyklendauern auftreten.

Die Verwendung von α_{AB} und dem somatischen τ_M bei den Konditionen 2 und 3 anstelle der Parameter anderer Zelllinien ist willkürlich. Werden andere Parameter verwendet, ergeben sich jedoch keine grundlegend anderen Ergebnisse (nicht gezeigt).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt wie oben beschrieben. In Abb. 3.34 sind die simulierten Zellvolumen und -zyklendauern den experimentellen für alle drei Konditionen gegenübergestellt. Abb. 3.34a vergleicht die in Kondition 1 und 3 auftretenden Zellvolumen V_{sim} mit den V_{exp} . Da keine konsistenten Asymmetrien auftreten, haben alle Zellen einer (gesamten) Generation im Mittel das gleiche Volumen. Innerhalb eines Simulationslaufes treten wegen des Rauschens ζ jedoch kleine Unterschiede auf. Die simulierten Keimbahnzellen sind somit deutlich zu groß, die Zellen der *AB*-Linie zu klein. Die Abweichungen bei den restlichen Zelllinien sind relativ klein; hier kompensieren sich die gemachten Fehler weitestgehend. Die mittlere Abweichung beträgt $\delta_V = 24\%$.

In Abb. 3.34b ist τ_{sim} gegen τ_{exp} für Kondition 1 aufgetragen. Trotz der großen Fehler der Zellvolumen sind die sich ergebenden Abweichungen relativ klein ($\delta_\tau = 7,8\%$). Eine Ausnahme hiervon bildet P_4 , die sich jedoch in der Simulation nicht mehr teilt. Der Grund für die geringen Abweichungen trotz der fehlerhaften Volumen ist, dass bei frühen Zellen die volumenunabhängige Mitosedauer τ_M der dominierende Beitrag zur Zellzyklendauer ist und sich diese nicht ändert. Aufgrund der Antikorrelation zwischen Volumen und Zyklendauer teilen sich nun vor allem die Keimbahnzellen zu früh, während insbesondere die *AB*-Zellen zu lange Zellzyklendauern aufweisen.

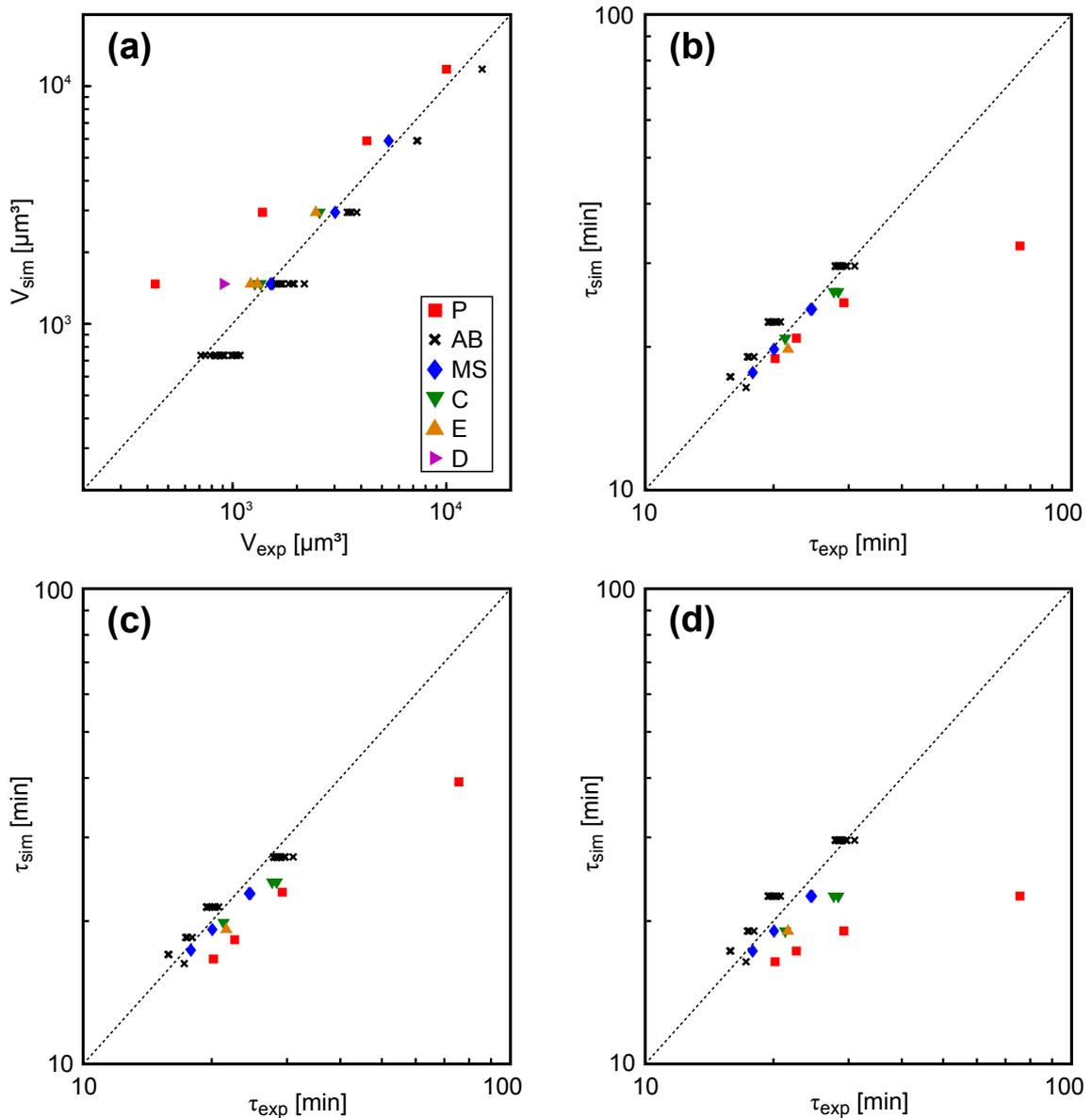


Abbildung 3.34.: Zellvolumina und -zyklendauern bei Störungen. Die in den Konditionen 1-3 auftretenden Zellvolumina V_{sim} und Zellzyklendauern τ_{sim} werden den experimentell bestimmten Werten V_{exp} und τ_{exp} gegenübergestellt. Die Darstellung folgt der in Abb. 3.31 verwendeten. **(a)** Bei den Konditionen 1 und 3 ist die Spindelverschiebung in der Keimbahn deaktiviert, d.h. $\Delta x = \zeta$ für alle Zellen. Die sich ergebenden Zellvolumina τ_{sim} weichen deutlich von den τ_{exp} ab (mittlere prozentuale Abweichung 24%). Alle Volumina einer Generation sind gleich. **(b)** Die großen Abweichungen der Zellvolumina führen bei Kondition 1 zu einer schlechteren Übereinstimmung der simulierten Zellzyklendauern τ_{sim} mit den τ_{exp} (mittlere prozentuale Abweichung 7,8%). **(c)** Werden die Zellvolumina zwar korrekt berechnet, aber keine linienspezifischen Parameter α und τ_M benutzt (Kondition 2), so steigen die mittleren prozentualen Abweichungen zwischen τ_{sim} und τ_{exp} auf 8,2%. **(d)** In Kondition 3 treten weder Spindelverschiebungen, noch linienspezifische Parameter α und τ_M auf. Somit sind neben den Volumina auch alle Zellzyklendauern einer Generation gleich und die mittleren prozentualen Abweichungen zwischen τ_{sim} und τ_{exp} steigen auf 10,5%

Werden die Volumina zwar korrekt berechnet, linienspezifische Unterschiede bei den Zellzyklendauern aber vernachlässigt (Kondition 2), so ergeben sich größere Abweichungen als bei Kondition 1 (Abb. 3.34c). Da α_{AB} für alle Zellen verwendet wird, stimmen τ_{sim} und τ_{exp} für alle AB -Zellen gut überein. Andere Zellzyklendauern werden aber generell unterschätzt. Die mittlere Abweichung beträgt hier $\delta_\tau = 8,2\%$.

Die größten Abweichungen bei Teilungszeiten treten erwartungsgemäß bei Kondition 3 auf, hier ist $\delta_\tau = 10,5\%$. Da sich alle in der Simulation gleichzeitig vorhandenen Zellen weder in ihrem Volumen (keine Asymmetrie) noch in ihren Parametern α und τ_M signifikant unterscheiden, teilen sich alle Zellen immer ungefähr gleichzeitig.

Die Ergebnisse der Simulationen werden für alle drei Konditionen mittels Korrelationen mit der experimentell beobachteten Zellanordnung verglichen. Dies ist in Abb. 3.35 dargestellt. Für alle Konditionen treten wieder die schon vorher beobachteten beiden Phänotypen 1 und 2 auf, allerdings in unterschiedlichen Häufigkeiten. Abb. 3.35a zeigt den Fall für Kondition 1. Die Anzahl abberanter Ergebnisse vom Phänotyp 2 steigt auf $n_2 = 14$, was einer Fehlerrate von $p_2 \approx 3\%$ entspricht. Insgesamt zeigt somit noch die überwiegende Mehrheit aller Simulationsläufe ein korrektes Ergebnis ($n_1 = 486$ bzw. $p_1 = 97\%$). Die Werte $\langle \bar{c} \rangle$ und $\langle c \rangle_{end}$ zeigen für beide Phänotypen keine Änderung im Vergleich zu den vorangegangenen Abschnitten. Zwar haben die simulierten Zellen signifikant falsche Volumina, was Einfluss auf die Reichweite der Kräfte (Gl. 1.2 & Gl. 1.3) haben sollte. Jedoch hängt die Reichweite der Kräfte nur vom Zellradius $R \propto V^{1/3}$ ab. Der Einfluss des Volumens auf die Kräfte ist somit gering. Schwerer wiegt er jedoch auf die Zellteilungszeitpunkte.

Bei Kondition 2 steigt die Fehlerrate stark an auf $p_2 = 11\%$ ($n_2 = 54$, siehe Abb. 3.35b). Dem entspricht eine Häufigkeit von $PT1$ von $p_1 = 89\%$ mit $n_1 = 446$ ($PT1$: $\langle \bar{c} \rangle = 0,94$ und $\langle c \rangle_{end} = 0,89$, $PT2$: $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$ und $\langle c \rangle_{end} = 0,71$). Dies deutet darauf hin, dass das in Kap. 3.5 beschriebene linienspezifische Verhalten der Zellzyklendauern für die Stabilität der Zellanordnung wichtiger ist als asymmetrische Zellteilungen.

In Abb. 3.35c sind schließlich die Korrelationen für Kondition 3 dargestellt. $PT2$ tritt mit einer nochmals deutlich erhöhten relativen Häufigkeit von $p_2 = 18\%$, d.h. in insgesamt $n_2 = 84$ Simulationsläufen, auf ($n_1 = 413$ bzw. $p_1 = 82\%$; $PT1$: $\langle \bar{c} \rangle = 0,93$ und $\langle c \rangle_{end} = 0,88$, $PT2$: $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$ und $\langle c \rangle_{end} = 0,69$).

Während die Simulationen mit den korrekten Parametern nahezu immer die experimentell beobachtete Zellanordnung reproduzieren, treten falsche Phänotypen vermehrt auf, wenn asymmetrische Zellteilungen oder linienspezifisches Verhalten vollständig vernachlässigt werden. Eine Frage, die sich stellt, ist die nach der Art des Überganges. Gibt es z.B. eine kritische Differenz zwischen α_P und $\alpha_{somatic}$, ab der die Zellanordnung robust ist, während beim Unterschreiten die Häufigkeit von $PT2$ sprunghaft steigt, oder ist der Übergang kontinuierlich? Dies soll im Folgenden getestet werden.

Hierzu wird eine Variante von Kondition 3 verwendet. Die Zellteilungszeiten aller somatischen Zellen werden durch die Parameter $\alpha_{somatic}$ und $\tau_{M,somatic}$ beschrieben (siehe oben). Die Teilungszeiten der Keimbahn sowie die Spindelverschiebungen werden jedoch gemäß

$$\begin{aligned} \Delta x' &= (1 - \varepsilon) \cdot \Delta x \\ \alpha'_P &= \alpha_P - \varepsilon \cdot (\alpha_P - \alpha_{somatic}) \\ \tau'_{M,P} &= \tau_{M,P} - \varepsilon \cdot (\tau_{M,P} - \tau_{somatic}) \end{aligned} \tag{3.43}$$

mit $0 \leq \varepsilon \leq 1$ berechnet. Ungestrichene Parameter besitzen oben genannte Werte, die gestrichenen werden im Folgenden für Simulationen benutzt. Für $\varepsilon = 0$ stimmt dies mit dem oben besprochenen Fall korrekter Parameter, d.h. dem ungestörten Fall, überein. Dort war die Fehlerrate $p_2 = 1\%$. $\varepsilon = 1$ hingegen entspricht Kondition 3 ($p_2 \approx 20\%$). Für ein

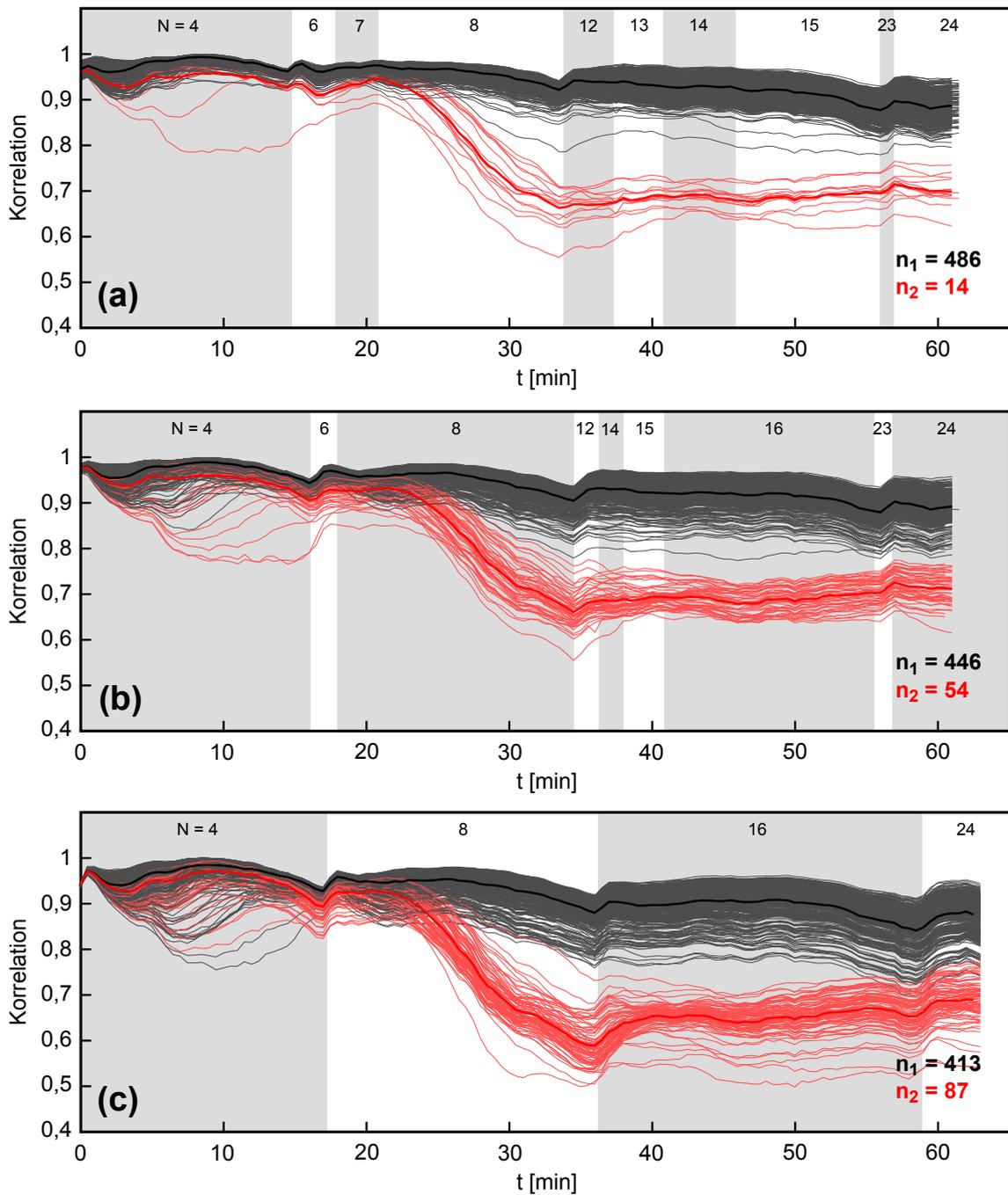


Abbildung 3.35.: Vergleich der Simulationen unter Störungen mit Trackingergebnissen. Die Abbildungen folgen der Darstellung in Abb. 3.32a. Sie zeigen die zeitabhängigen Korrelationen der Ergebnisse von jeweils 500 Simulationsläufen bei den Konditionen 1 bis 3 mit den mittleren experimentellen Zellkerntrajektorien. **(a)** Bei Kondition 1 ergeben sich $n_1 = 486$ Simulationen mit *PT1*, $n_2 = 14$ mit *PT2* als Ergebnis (graue bzw. rote Linien). Die Median-Werte der gemittelten Korrelationen (dicke schwarze bzw. rote Linie) sind $\langle \bar{c} \rangle = 0,95$ für *PT1* und $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$ für *PT2*. **(b)** Kondition 2 liefert $n_1 = 446$ Simulationen mit *PT1*, $n_2 = 54$ mit *PT2* als Ergebnis. Weiterhin gilt $\langle \bar{c} \rangle = 0,94$ für *PT1* und $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$ für *PT2*. **(c)** In Kondition 3 werden schließlich $n_1 = 413$ Simulationen mit *PT1*, $n_2 = 87$ mit *PT2* erhalten. Es ist $\langle \bar{c} \rangle = 0,93$ für *PT1* und $\langle \bar{c} \rangle = 0,73$ für *PT2*. Für die Konditionen ergeben sich somit unterschiedliche Fehlerraten (d.h. relative Häufigkeiten von n_2).

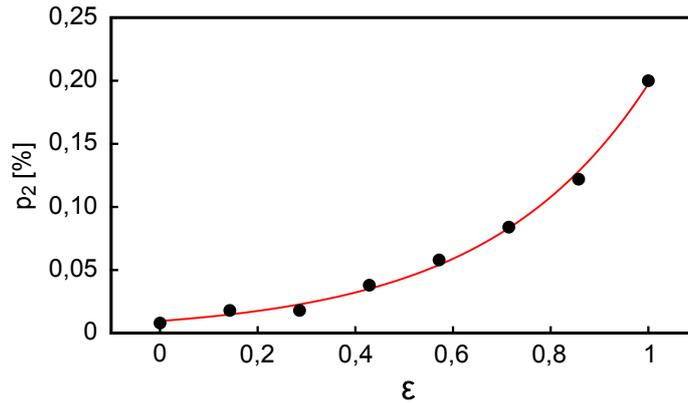


Abbildung 3.36.: Fehlerrate bei graduell erhöhter Störung. Die in der Simulation für Zellteilungen der Keimbahn verantwortlichen Parameter Δx , α_P und $\tau_{M,P}$ wurden gemäß Gl. 3.43 gestört. Für somatische Zellen wurden die weiter oben genannten Werte $\alpha_{somatic}$ und $\tau_{M,S}$ verwendet. Für $\varepsilon = 0$ liegt der ungestörte Zustand vor. Für $\varepsilon = 1$ entsprechen die Simulationen jenen bei Kondition 3. Der Grad der Störung kann somit graduell erhöht werden. Für jedes verwendete ε wurden 500 Simulationsläufe berechnet und die Fehlerrate $p_2 = n_2/500$ berechnet (schwarze Punkte). Die Fehlerrate p_2 zeigt eine exponentielle Abhängigkeit von ε (rote Linie). Erst im ungestörten Fall ($\varepsilon = 0$) fällt p_2 auf 1 %.

ε zwischen diesen Extrema ergibt sich folglich ein Übergangsbereich. Die Abweichungen vom ungestörten Fall werden umso größer, je größer ε wird.

Es werden für acht ε -Werte jeweils 500 Simulationen berechnet. Die erhaltenen Fehleraten $p_2(\varepsilon)$ sind in Abb. 3.36 aufgetragen. Es zeigt sich, dass der Übergang zwischen den Extremen kontinuierlich verläuft. Weiterhin steigt die Fehlerrate p_2 ungefähr exponentiell mit ε (siehe Fitkurve in Abb. 3.36). Die Fehlerrate von $p_2 = 1\%$, die der realer Embryonen entspricht [27], wird gerade für den ungestörten Fall erreicht.

Insgesamt konnte somit anhand von Simulationen gezeigt werden, dass sowohl geometrisch asymmetrische Zellteilungen, als auch linienspezifisches Verhalten der Zellzyklendauern einen Einfluss auf die Robustheit der Zellanordnungen hat. Die Zellanordnung ist gerade im ungestörten Fall überaus stabil reproduzierbar.

Gründe für das Auftreten zweier Phänotypen

Bisher wurden die Ergebnisse der Simulation in die beiden Phänotypen $PT1$ und $PT2$ unterteilt, die eine grundlegend andere Zellanordnung am Ende der Simulation aufweisen. Hier soll nun eine Begründung für das Auftreten dieser beiden Phänotypen gegeben werden.

Wie an den Korrelationen (Abb. 3.32, 3.33 und 3.35) ablesbar ist, treten erste größere Abweichungen zwischen beiden Phänotypen erst gegen Ende des achtzelligen Zustandes auf. Die Zellanordnungen, die zu diesem Zustand führen, sind in Abb. 3.37 schematisch dargestellt.

Abb. 3.37a zeigt die Vorgänge in ungestörten Embryonen. Die vier vorhandenen Zellen der AB -Linie liegen in der dorsalen Hälfte des Embryos, ventral befindet sich P_2 am posterioren Ende, EMS liegt mittig bis anterior. Zudem befinden sich die beiden linken AB -Zellen ($ABal$ & $ABpl$) anterior gegenüber ihren Schwesterzellen. Die Symmetrie bezüglich der LR-Achse ist somit bereits gebrochen (Abb. 3.37a, erstes Bild v.l.). Als nächstes erfolgt die Teilung der Zelle EMS entlang der AP-Achse (zweites Bild v.l.). Wegen $\alpha_P > \alpha_{somatic}$ und $\tau_{M,P} > \tau_{M,somatic}$ besteht der nun vorliegende siebenzellige Zustand für einige wenige Minuten (siehe z.B. Abb. 3.32a). Aufgrund der durch die AB -Zellen

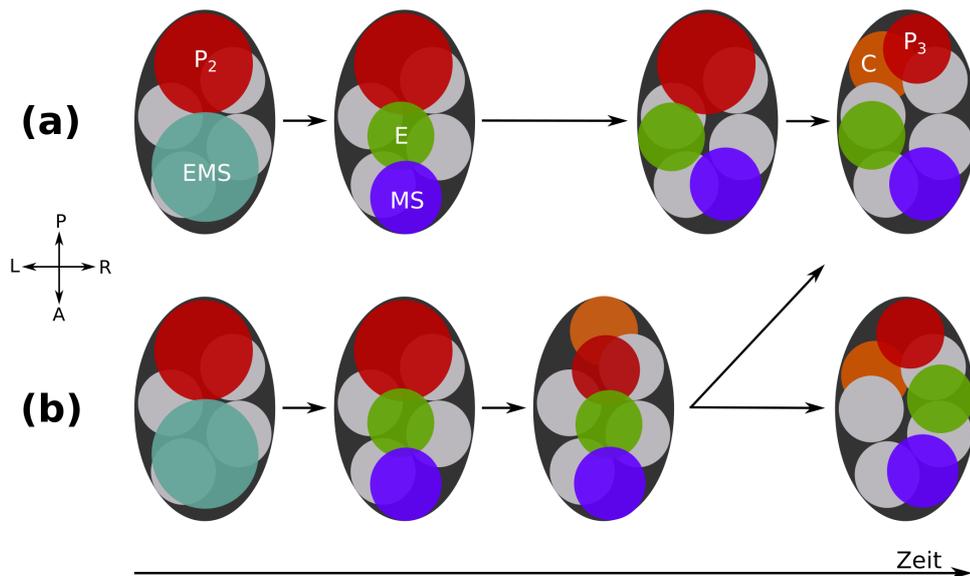


Abbildung 3.37.: Entstehung zweier Phänotypen. Schematische Abfolge der Zellanordnungen in ungestörten und gestörten Embryonen. **(a)** In ungestörten Embryonen liegt der siebenzellige Zustand hinreichend lange vor, sodass sich die Zellen E und MS wie gezeigt umordnen können. Aufgrund der von den vier Zellen der AB -Linie (grau) bereits gebrochenen Symmetrie ist diese Art der Umordnung deutlich favorisiert (Phänotyp 1). **(b)** Je größer die Störung ist, desto kürzer wird die Dauer des siebenzelligen Zustandes (bei Kondition 3 wird er gänzlich übersprungen). Somit kann eine lineare Anordnung der Zellen MS , E , C und P_3 entstehen, bei welcher die wirkenden interzellulären Kräfte groß sind. In einem Teil der (simulierten) Embryonen erfolgt daraus eine Umordnung der Zellen, bei welcher sich sowohl E als auch MS in der rechten Hälfte des Embryos befinden (Phänotyp 2). Details siehe Text.

gebrochenen Symmetrie ist es für MS günstig, etwas nach rechts zu migrieren, während E aus dem selben Grund nach links wandert (Abb. 3.37a, drittes Bild v.l.). Nach dieser Umordnung teilt sich schließlich P_2 in der AP-DV-Ebene. Für deren Tochterzellen ist schließlich eine Umordnung im Sinne des Modells zu bevorzugen, wie sie im vierten Bild v.l. in Abb. 3.37a gezeigt ist. Diese Anordnung entspricht der in realen Embryonen typischerweise beobachteten. Ausgehend hiervon liefern die Simulationen auch für spätere Zeiten korrekte Ergebnisse ($PT1$).

Der Grund für das Auftreten des $PT2$ liegt in einer falschen Umordnung der Zellen MS und E (Abb. 3.37b). P_2 und EMS teilen sich entlang den eben dargelegten Achsen. Ist der zeitliche Abstand zwischen der Teilung beider Zellen nicht genügend groß, kann die beschriebene Umordnung von MS und E nicht stattfinden, bevor P_2 sich teilt. Es entsteht somit eine lineare Anordnung aller vier Tochterzellen P_3 , C , E und MS entlang der Eihülle (Abb. 3.37b, drittes Bild v.l.). In dieser "gepressten" Lage der Zellen sind die herrschenden Kräfte F_W groß. Unter Umständen führt dies zu einer Migration von E und MS nach rechts (Abb. 3.37b, viertes Bild v.l.). Ausgehend von dort, akkumulieren sich Fehler in der Zellanordnung, so dass am Ende des simulierten Zeitraumes die Zellen gemäß dem Phänotyp $PT2$ verteilt vorliegen.

Die beschriebene Situation gilt für die untersuchten Konditionen unterschiedlich stark ausgeprägt. In der ungestörten Kondition (Verwendung richtiger Parameterwerte) existiert der siebenzellige Zustand zwar relativ lange, dennoch tritt $PT2$ in einigen wenigen Simulationen als Resultat auf. Dies ist auf das Rauschen der Zellbewegung ξ zurückzuführen. Je kürzer der sechs- bzw. siebenzellige Zustand wird, desto höher wird der Anteil des $PT2$ (vgl. Abb. 3.35; während des sechszelligen Zustandes findet in ungestörten Embryo-

nen die Umordnung der AB -Zellen statt, die die LR-Symmetrie bricht). Die Kondition 3 ist hierbei der Extremfall, bei dem sowohl der sechs- als auch der siebenzellige Zustand vollständig übersprungen werden.

3.6.3. Diskussion

Die zentralen Ergebnisse dieses Kapitels sind:

- Durch die Erkenntnisse aus Kap. 3.3 und Kap. 3.5 kann ein Großteil der direkten Parameter im Modell zur Zellanordnung durch Vorhersagen ersetzt werden.
- Hiermit kann die Zellanordnung bis zum 24-zelligen Zustand stabil reproduziert werden, d.h. bis kurz vor Einsetzen der Gastrulation. Die Zellanordnung bis zu diesem Zustand kann somit als Relaxationsprozess beschrieben werden.
- Zudem kann nun anhand von Simulationen der Einfluss asymmetrischer Zellteilungen sowie der Linienabhängigkeit der Zellzyklendauern auf die Stabilität der Zellanordnung untersucht werden. Es zeigt sich, dass diese relativ robust auf fehlende Asymmetrie der Zellteilungen reagiert. Die Linienabhängigkeit der Zellzyklendauern hat hier einen größeren Einfluss.

In der Einleitung dieses Kapitels wurden zwei Ziele formuliert. Dies war einerseits die Erweiterung des Modells auf Zustände mit mehr als zwölf Zellen und außerdem die Reduktion direkter Parameter. Beide Ziele wurden erreicht.

Zuerst konnten mit den Ergebnissen aus Kap. 3.3 und Kap. 3.5 zwei Drittel aller direkten Parameter durch wenige Fitparameter ersetzt werden, ohne dass die Präzision des Modells beeinträchtigt wurde. Hierdurch verbleibt derzeit nur die Abhängigkeit von experimentell bestimmten Zellteilungsachsen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Modell in der jetzigen Form in der Lage ist, die Zellanordnung bis zum 24-zelligen Zustand korrekt wiederzugeben. Kurz nach diesem Zustand setzt die Gastrulation ein, bei welcher erste anisotrope Kräfte auftreten. Dort verliert das aktuelle Modell somit seine Gültigkeit (siehe Einleitung, Kap. 3.6.1). Die Gültigkeit bis zu diesem Zustand unterstützt die Annahme, dass die Zellanordnung tatsächlich für die gesamte Zeitspanne vor der Gastrulation als Relaxationsprozess angesehen werden kann, bei welchem keine regulierte oder aktiv getriebene Zellmigration auftritt. Dies war vorher nur für Zustände mit $n \leq 12$ Zellen gezeigt.

Darüber hinaus konnte das aktualisierte Modell genutzt werden, um einen Teil der Erkenntnisse dieser Arbeit auf ihren Einfluss auf die Robustheit der Embryogenese des *C. elegans* zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass die Zellanordnungen in den Simulationen auch dann stabil erreicht werden, wenn sich die α -Werte somatischer Linien nicht unterscheiden. Hingegen nimmt die Fehlerrate zu, wenn keine geometrisch asymmetrischen Zellteilungen auftreten, oder die signifikante Verzögerung der Keimbahn ($\alpha_P > \alpha_{somatic}$) fehlt. Die Verzögerung der Keimbahnteilungen hat sich hier als deutlich relevanter als die geometrischen Asymmetrien bei Zellteilungen herausgestellt. Diese Ergebnisse komplementieren somit jene aus Kap. 3.3 und Kap. 3.5. Sie stehen weiterhin im Zusammenhang mit Ergebnissen aus Kap. 3.1.2, in dem die Zellanordnungen bei entfernter Chitinhülle untersucht wurden. In allen genannten Fällen, ob in der Simulation oder im Experiment, zeigt ein großer Teil der Embryonen selbst bei starker Störung die richtige Zellanordnung. Dies unterstreicht die Robustheit dieses Prozesses.

Um eine korrekte Interpretation der Simulationsergebnisse zu erlauben, sei hier noch auf zwei Umstände hingewiesen. Erstens hängen die beobachteten Fehlerraten p_2 von der

Stärke des Rauschens ξ ab. Der Zusammenhang wurde hier nicht explizit untersucht. Je stärker das Rauschen, desto größer ist auch die auftretende Fehlerrate. Die Absolutwerte von p_2 sind daher nur eingeschränkt aussagekräftig, vielmehr muss die relative Zu- oder Abnahme herangezogen werden, wenn zwei untersuchte Konditionen verglichen werden. Da die Varianz von ξ in allen berechneten Simulationen den gleichen Wert hatte, sind die gezogenen Schlüsse von dieser Tatsache jedoch nicht grundsätzlich beeinträchtigt: Korrekte Parameter führen zu einer kleinen Fehlerrate, die sich erhöht, sobald die Parameter gestört werden.

Außerdem können anhand des Modells in seiner jetzigen Form nur Aussagen darüber getroffen darüber werden, ob ein Effekt zur Stabilität beiträgt. So steigt z.B. die Fehlerrate stark an, wenn die unterschiedliche Skalierung der Zellzyklendauern in somatischen und Keimbahnzellen fehlt. Dies wurde so interpretiert, dass dieser Unterschied ein verantwortlicher Faktor für die Wiederholgenauigkeit bei der Zellanordnung ist. Der Umkehrschluss ist jedoch nicht ohne Weiteres zulässig: Gilt $\alpha_P = \alpha_{somatic}$, so steigt zwar p_2 in den Simulationen an. Dies muss aber nicht notwendigerweise eine fehlerhafte Zellanordnung in realen Embryonen nach sich ziehen. Der Grund hierfür ist, dass im Modell viele denkbare Prozesse schlicht vernachlässigt werden. So kann der Embryo z.B. auf initiale Fehlanordnungen mit einem Korrekturmechanismus reagieren, der bisher nicht bekannt ist und somit auch im Modell fehlt (z.B. eine Anpassung der Teilungsachsen o.ä.).

Zuletzt soll noch auf einen Widerspruch eingegangen werden, der zwischen den Ergebnissen dieses Kapitels und jenen der Diplomarbeit des Autors entsteht [1] (siehe auch [2]). Dort wurde festgestellt, dass die Teilungszeitpunkte nahezu keinen Einfluss auf die beobachteten Zellanordnungen haben. Dieser Widerspruch ergibt sich aus der Tatsache, dass die Simulationen zum damaligen Zeitpunkt nur bis zum 12-zelligen Zustand berechnet wurden. Die hier gefundenen Abweichungen bei *PT2* haben ihren Ursprung im achtzelligen Zustand. Bis zum 12-zelligen Zustand sind die insgesamt auftretenden Abweichungen noch relativ klein, da die betreffenden Zellen (*MS*, *E*, *C* und *P₄*) noch keine weitere Zellteilung durchlaufen haben und die Zellnachbarschaften im Wesentlichen noch den ungestörten entsprechen. In [1, 2] konnten die hier beobachteten Effekte daher noch nicht aufgefunden werden.

4.1. Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, Gründe für die bemerkenswerte Wiederholgenauigkeit der Embryogenese des *C. elegans* aufzufinden (siehe Einleitungen in Kap. 1 und Kap. 3). Diese Fragestellung konnte aufgrund der Komplexität des Systems nicht in vollem Umfang beantwortet werden, da dies den Rahmen der vorliegenden Arbeit deutlich sprengen würde. Dennoch konnten, vor allem für die frühesten Stadien vor dem Beginn der Gastrulation, einige Mechanismen aufgedeckt werden, die zur Stabilität maßgeblich beitragen.

Die auftretenden frühen Zellanordnungen sind nahezu invariant [1, 2]. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass die beobachteten Zellbewegungen einem einfachen mechanischen und von Zellteilungen getriebenen Relaxationsprozess entsprechen (vgl. Kap. 1.1.4 & Kap. 3.6). Für Stabilität sorgen hier einerseits deterministische und wiederholgenaue Randbedingungen in Form der starren Einhülle (siehe Kap. 3.1.2 und [1, 61]). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Umgebungstemperatur nur die Gesamtgeschwindigkeit der Entwicklung beeinflusst (vgl. Kap. 3.1.1). Hierdurch ist die Zellanordnung stabil gegenüber Temperaturschwankungen.

Da Zellbewegungen von Zellteilungen getrieben werden, stellen deren Eigenschaften einen dritten wichtigen Aspekt für die Wiederholgenauigkeit der Zellanordnung dar. In dieser Arbeit wurden die geometrischen Asymmetrien der Zellteilungen sowie die Zellzyklendauern untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Teilungsverhältnisse für unterschiedliche Zellen zwar unterschiedliche Werte annehmen, diese aber in verschiedenen Embryonen im Rahmen statistischer Schwankungen wiederholgenau sind. Somit sind auch die auftretenden Zellvolumen reproduzierbar. Die in somatischen Zellen auftretenden Teilungsasymmetrien stammen wahrscheinlich von sterischen Effekten in Form von Kräften, die auf die Zellen einwirken. Diese hängen von der Anordnung der umgebenden Zellen ab, so dass hier eine Rückkopplung zwischen Zellanordnung und Zellvolumen entsteht. Aus immer gleichen Zellanordnungen folgen somit immer gleiche Zellvolumen in somatischen Zellen (die wiederum die Zellanordnung schwach beeinflussen, Kap. 3.6). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Asymmetrien in (postzygotischen) Keimbahnzellen durch eine Verschiebung der mitotischen Spindel verursacht werden, die von der Zellgröße entkoppelt und konstant ist. Diese Spindelverschiebung ist mit einem einfachen mechanischen Modell erklärbar, welches über die wirkenden Kräfte mittelbar von der biochemischen Zusammensetzung der Zellen abhängt. Zusammen mit den bekannten Mechanismen der Symmetriebrechung und der darauffolgenden Polarisation der Zellen [20], ergibt sich die Wiederholgenauigkeit der Vorgänge: aus einer ähnlichen biochemischen Zusammensetzung

der Zygote in allen Individuen folgen ähnliche Kräfte, ergo Spindelverschiebungen und damit Zellgrößen.

Insbesondere die Zeitpunkte der Zellteilungen stellten sich in dieser Arbeit als für die Wiederholgenauigkeit der Zellanordnung relevant heraus (vgl. Kap. 3.6). Wie in Kap. 3.3 gezeigt wurde, sind die Zellzyklendauern reproduzierbar und mit dem Zellvolumen anti-korreliert. Die Abhängigkeit konnte über ein Modell limitierender Komponenten in Kombination mit deren Partitionierung bei Zellteilungen erklärt werden. Dies liefert innerhalb des Modells erneut reproduzierbare Zellteilungszeitpunkte, wenn die initiale biochemische Zusammensetzung der Zygote für alle Individuen vergleichbar gleich ist.

In dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden die Zellteilungsachsen, die die dritte für die Zellanordnung relevante Eigenschaft der Zellteilungen darstellen [1, 2]. Diese werden von der während der Zellteilung vorliegenden Zellanordnung auf zwei Arten beeinflusst. Erstens über mechanische Kräfte zwischen den Zellen und zweitens über Signaltransduktionen, welche die Empfängerzelle polarisieren und somit die Spindel ausrichten [95] (siehe Ausblick, Kap. 4.2). Bezüglich der Teilungsachsen liegt daher wahrscheinlich ein sich selbst stabilisierendes System vor: gleiche Zellanordnung führen zu wiederholgenauen Achsen, die wiederum die Zellanordnung stabilisieren.

Darüber hinaus wurde das Verhalten der Zellkerngröße während der Interphase erstmals eingehend untersucht. Ebenso wie die anderen bereits angesprochenen Observablen verhalten sich diese in allen untersuchten Embryonen wiederholgenau. Die in Kap. 3.4 aufgezeigten Modellierungsansätze beruhen auf limitierenden Komponenten, so dass sich auch hier die Reproduzierbarkeit im Wesentlichen aus der biochemischen Zusammensetzung der Zygote ergibt, d.h., aus der absolut vorhandenen Menge der limitierenden Komponente.

Zusammenfassend bietet sich damit folgendes Bild: die Stabilität der frühen Embryogenese lässt sich durch das Zusammenspiel aus wiederholgenauen Anfangs- und Randbedingungen mit relativ "einfachen", darauf aufbauenden Prozessen erklären. Eine relevante Anfangsbedingung ist zum Beispiel die biochemische Zusammensetzung der Zygote, wobei in dieser Arbeit Hinweise gefunden wurden, dass die Konzentration der Komponenten in jedem Embryo ungefähr gleich ist (vgl. Kap. 3.4 & Kap. 3.5). Die Randbedingungen werden hingegen von der Eihülle vorgegeben, welche in jedem Embryo etwa gleich groß [1] und hinreichend starr ist, um deterministische Kräfte zu generieren (vgl. Kap. 3.1.2). Die innerhalb dieser Rand- und Anfangsbedingungen ablaufenden Prozesse können mechanischer Natur sein (Zellbewegung, Spindelverschiebung) oder auf limitierenden Komponenten aufbauen (Nukleusgrößen, Zellzyklendauern).

4.2. Ausblick

Abschließend sollen noch einige Ansätze für zukünftige Arbeiten aufgezeigt werden, mit welchen die bisher gesammelten Erkenntnisse ergänzt werden können.

Wie oben angesprochen, wurden Zellteilungsachsen noch nicht eingehend untersucht. Sie sind somit die letzten im Modell zur Zellanordnung vorhandenen direkten Eingabeparameter. Eine Vorhersage der Achsen, ebenso wie die der Teilungszeitpunkte und -asymmetrien, würde das Modell nahezu eigenständig und nur noch von wenigen Fitparametern abhängig machen.

Die Zellteilungsachsen während der frühesten Stadien können anhand von zwei Mustern beschrieben werden [1, 95]. Zellen der AB -Linie zeigen ein orthogonales Schema: nach der Teilung von P_0 entlang der AP-Achse teilt sich AB entlang der DV-Achse, ihre Töchter ($AB(2)$) teilen sich schließlich ungefähr entlang der LR-Achse. In der nächsten Generation sollten sich die $AB(3)$ -Zellen schließlich wieder entlang der AP-Achse teilen. In ungestörten

Embryonen (mit Chitinhülle) kollabiert dieses Schema jedoch zu dieser Zeit und die Achsen der $AB(3)$ -Zellen weichen deutlich von der AP-Achse ab. Die restlichen Zellen (P_1 , EMS , MS , E , C) gehören dem zweiten auftretenden Muster an, bei dem die Achsen immer entlang der AP-Achse ausgerichtet sind. Mit fortlaufender Entwicklung wird auch dieses Schema immer diffuser, so teilt sich z.B. bereits P_2 entlang einer davon abweichenden Achse.

Es ist bekannt, dass die Teilungsachsen von einigen Zellen auch von ihren Nachbarn mittels Signaltransduktion beeinflusst werden, während die Achsen in anderen Zellen intern festgelegt werden [95]. So ist z.B. die Teilungsachse von EMS immer in Richtung des Kontakts zu P_2 orientiert, während die Achsen in ABa und ABp von solchen Wechselwirkungen nicht beeinflusst werden [95].

Während dieser Arbeit wurde klar, dass auch sterische Effekte einen signifikanten Einfluss auf die beobachteten Achsen haben. In Embryonen ohne starre Chitinhülle unterscheiden sich die Teilungsachsen z.T. deutlich von jenen in ungestörten Embryonen. Ein Beispiel sind die Achsen der $AB(3)$ -Zellen, die sich in einigen Embryonen ohne Chitinhülle wie oben vorhergesagt entlang der AP-Achse teilten (nicht gezeigt). Es kann vermutet werden, dass sterische Effekt über die erreichten Zellformen Einfluss auf die Teilungsachsen nehmen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die sog. Hertwig'sche Regel, gemäß derer sich Zellen bevorzugt entlang ihrer längsten Ausdehnung teilen [231].

Zusammenfassend lässt damit sich sagen, dass die Teilungsachsen von mindestens drei Faktoren beeinflusst werden: der Zellform, den Achsen in früheren Generationen sowie Signaltransduktionen. Ein Modell, das alle frühen Teilungsachsen konsistent erklären soll, muss somit alle drei Faktoren berücksichtigen.

Zukünftige Arbeiten an dieser Thematik werden Methoden, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, sowie neue experimentelle Ansätze umfassen. Zu letzterem gehört etwa die gezielte Abtötung einer Zelle mittels Laser-Ablation, um die geometrischen Rahmenbedingungen für ihre Nachbarn zu ändern (das experimentelle Setup hierfür ist am Lehrstuhl mittlerweile vorhanden). Dies kann in ungestörten Embryonen oder solchen ohne Chitinhülle geschehen. Somit kann eine Vielzahl an möglichen Konfigurationen getestet werden. Durch Segmentierung der Plasmamembranen und Tracking der Zellkerne können daraufhin jeweils die Zellformen sowie die daraus folgenden Teilungsachsen bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden Zellformen anhand der Segmentierungsergebnisse zwar noch nicht ausgewertet (mit Ausnahme der Asphärität, Kap. A.2), eine Basis an Auswertungsroutinen z.B. zur Bestimmung der lokalen Krümmungen aus den Segmentierungen wurde vom Autor jedoch bereits entwickelt.

Die aktuelle Version des Modells zur Zellanordnung kann nicht um eine Vorhersage der Teilungsachsen ergänzt werden, da in ihr die Zellformen nicht bekannt sind. Die Simulation muss somit umgestaltet werden. Eine erste Realisierung einer derartig umgestalteten Simulation wurde im Verlauf dieser Arbeit vom Autor bereits entworfen. Anstelle von miteinander wechselwirkenden Massenpunkten werden die Zellen darin als dreidimensionale Objekte modelliert. Dies geschieht mittels Oberflächentriangulierungen, d.h., eine Zelle i wird durch eine Menge von N_i Punkten p_j ($j = 1, \dots, N_i$) auf ihrer Oberfläche sowie Verbindungen der N_i Punkte dargestellt (siehe Abb. 4.1a). Anhand von dieser Triangulierung kann für jede Zelle i deren aktuelles Volumen V_i , deren Oberfläche A_i oder auch deren (lokale) Krümmung κ_i berechnet werden. Wird nun ein geeignetes Energiefunktional definiert, so dass einer Zelle i die Energie $E_i(V_i, A_i, \kappa_i)$ zugewiesen werden kann, dann kann die Gesamtenergie des Systems mittels einer Monte-Carlo-Simulation minimiert werden. Dabei werden einzelne Punkte p_j zufällig leicht verschoben. Verringert sich die Energie, wird diese Verschiebung akzeptiert, ansonsten mit einer Boltzmann-verteilten Wahrschein-

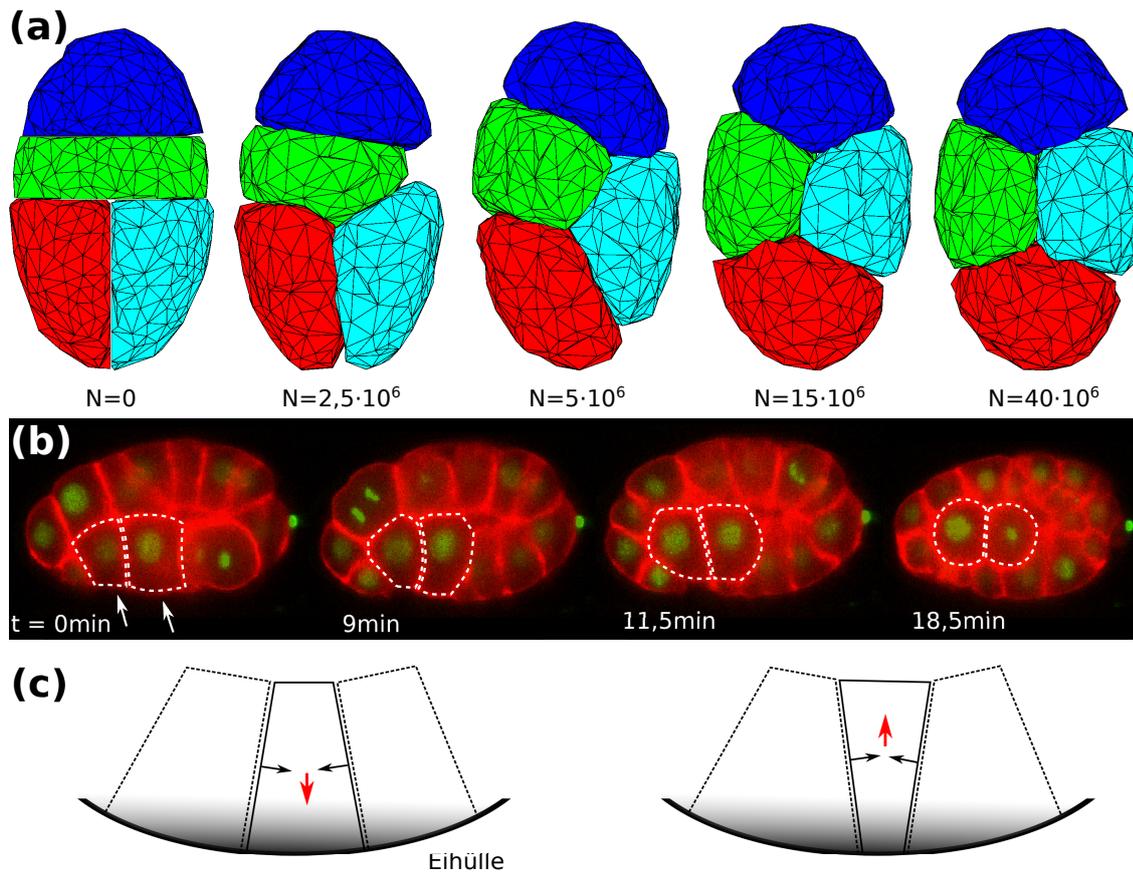


Abbildung 4.1.: Monte-Carlo-Simulationen & Gastrulation. (a) Monte-Carlo-Simulationen auf Oberflächentriangulierungen bieten einen möglichen Ansatz für eine Erweiterung des Modells zur Zellanordnungen. Hierbei werden Zellen durch eine Menge triangulierter Punkte dargestellt. Zufällige Verschiebungen werden anhand eines Energiefunktionals klassifiziert und entweder akzeptiert oder verworfen. Im gezeigten Fall wurden vier Zellen (blau, grün, rot, cyan) in einer ellipsoidalen Geometrie initialisiert. Das Energiefunktional wurde so gewählt, dass die Zellvolumina erhalten, die Oberflächen jedoch minimiert werden. Die initiale Zellanordnung ist gemäß diesem Energiefunktional ungünstig (links). Mit steigender Anzahl an Iterationen N relaxieren die Zellen in eine energetisch günstige Anordnung und verbleiben dort (rechts). Details siehe Text. (b) Vorgänge bei dem Beginn der Gastrulation in einem Embryo der Linie OD95 (Plasmamembranen rot, Chromatin grün). Bei $t = 0$ min befinden sich alle Zellen in Kontakt mit der Eihülle, insbesondere die Zellen Ea und Ep (Pfeile, Plasmamembranen weiß hervorgehoben). Diese Zellen beginnen nun, die der Eihülle zugewandten Abschnitte der Plasmamembran zusammen zu ziehen (*apical constriction*, Beginn bei $t = 9$ min). Hierdurch schieben sich Nachbarzellen unter sie, so dass Ea und Ep in den Innenraum gedrängt werden ($t = 11,5$ min). Bei $t = 18,5$ min befinden sie sich schließlich in der Mitte der Zellanordnung. Die embryonale Länge beträgt jeweils etwa $50 \mu\text{m}$. (c) Diese Vorgänge sind schematisch nochmals dargestellt. Vor dem Einsetzen der *apical constriction* sind alle Zellen in Kontakt zur Eihülle. Die resultierenden Zellformen sorgen dafür, dass die insgesamt wirkende Zell-Zell-Wechselwirkung (im Modell: $\sum F_C$, roter Pfeil) nach außen zeigt (links). Nach dem Zusammenziehen der äußeren Membran ändert sich die Zellform, so dass die Gesamtkraft nun ihre Richtung ändert und für die betreffende Zelle in den Innenraum zeigt (roter Pfeil, rechts). Für alle anderen Zellen ergeben sich weiterhin nach außen gerichtete Kräfte. Insofern kann auch die Zellumordnung während der Gastrulation unter Umständen als Relaxationsprozess interpretiert werden, wobei die Zellen lediglich ihre eigene Form aktiv kontrollieren.

lichkeit verworfen. Bei mehreren Zellen muss als Nebenbedingung Überschneidungsfreiheit sichergestellt werden. Dieses Vorgehen ist in Abb. 4.1a als “*proof-of-concept-Simulation*” gezeigt. Die vier dort simulierten Zellen wurden in einer energetisch ungünstigen Lage innerhalb einer ellipsoidalen Geometrie initialisiert (Abb. 4.1a, links). Das Energiefunktional wurde so gewählt, dass jede Zelle ihr initiales Volumen erhält, aber einer minimalen Ober-

fläche entgegenstrebt ($E_i \propto a\Delta V_i^4 + bA^2$, $a, b > 0$, Krümmungsbeiträge vernachlässigt). Der energetisch günstigste Zustand ist hier eine rautenförmige Anordnung, wie sie auch in ungestörten Embryonen des *C. elegans* auftritt. In der Tat wird eine solche Anordnung in der Simulation erreicht und nicht mehr verlassen (Abb. 4.1a, rechts). Trotz Optimierung des Quellcodes der Simulation dauert die Berechnung relativ lange (die in Abb. 4.1a gezeigte Simulation benötigte ca. 2 h). Der Grund für die langen Rechenzeiten liegen zum einen in der großen Anzahl an Iterationen der Monte-Carlo-Simulation, jedoch vor allem an den benötigten Überschneidungstests, d.h., ob ein Punkt der Zelle i nach Verschiebung in Zelle k liegt. Hier bestehen kaum noch Optimierungsmöglichkeiten: Die Rechenzeit pro Test hängt nicht mehr von N_i ab, ist also von konstanter Ordnung.

Insofern liegt der Schlüssel für eine Erweiterung des Modells zur Zellanordnung eventuell in einer Kombination beider Ansätze, d.h., in der Simulation von Massenpunkten während der Zellmigration und der Bestimmung der Zellformen während Zellteilungen mittels der dargestellten Monte-Carlo-Simulationen.

Ein weiterer Vorteil der letztgenannten ist, dass dort auch anisotrope Kräfte vorgegeben werden können, z.B. über die Gewichtung der Punkte/Dreiecke im Energiefunktional. Somit besteht eine Möglichkeit, das Modell zur Zellanordnung auch auf Zustände nach der Gastrulation zu erweitern. Es wurde bereits angesprochen, dass diese durch ein Zusammenziehen der äußeren Zellmembranen in *Ea* und *Ep* initialisiert wird (*apical constriction*) [51]. Dies ist in Abb. 4.1b für einen Embryo der Linie OD95 dargestellt. Wie sich zeigt, existiert (im Modell) eine Energiebarriere zwischen Positionen mit Kontakt zur Eihülle und solchen im Innenraum des Embryos. Wird in der aktuellen Simulation zur Zellanordnung nach den energetisch günstigsten Anordnungen gesucht, so befinden sich bereits ab dem zwölfzelligen Zustand Zellen im Innenraum. Dass in den bisher gezeigten Simulationen sowie in realen Embryonen bis zum 24-zelligen Zustand alle Zellen Kontakt zur Eihülle haben, ist auf diese Energiebarriere und die Teilungsachsen zurückzuführen (jene sind im Wesentlichen immer parallel zur Eihülle). Die Energiebarriere wird verständlich, wenn die typischen Zellformen betrachtet werden (Abb. 4.1c, links). Durch die Krümmung der Eihülle ist die resultierende Kraft aller Nachbarzellen nach außen gerichtet, so dass ein Wandern in den Innenraum nicht ohne Weiteres möglich ist. Zieht sich nun jedoch die außen liegende Membran zusammen, so ändert sich die Zellform und die resultierende Kraft zeigt in den Innenraum des Embryos (Abb. 4.1c, rechts). Ab diesem Moment wird die Zelle somit passiv von der Eihülle weg gedrückt. Daher kann spekuliert werden, dass auch die Vorgänge während der Gastrulation noch einen Relaxationsprozess darstellen, wobei jedoch einige Zellformen aktiv kontrolliert werden.

Vielversprechende zukünftige Projekte umfassen daher die eingehende Untersuchung der Zellteilungsachsen sowie eine erneute Erweiterung des Modells zur Zellanordnung auf Zustände während der Gastrulation. Zusammen mit der Entwicklung experimenteller Aufbauten durch Philipp Struntz wurde in der vorliegenden Arbeit hierfür eine breite Basis gelegt. Dies gilt sowohl im Hinblick auf experimentelle Methoden, als auch für den vorhandenen Quellcode zur Bildverarbeitung und Simulation der Embryogenese.

A.1. Embryonische Rotationen

In Kap. 3.1.2 wurde eine Rotation des gesamten Zellpaketes innerhalb der Eihülle um die AP-Achse angesprochen. Zwei Beispiele für solche Rotationen sind in Abb. A.1 gezeigt. Die Bilder zeigen Maximumintensitätsprojektionen des Chromatin-Kanals von Embryonen der Linie OD95 entlang der AP- und einer dazu senkrechten Achse. Darauf sind die Ergebnisse des Trackings für die letzten fünf Bildstapel, d.h. für insgesamt 2,5 min der Entwicklung, überlagert dargestellt (blau für die obere Hälfte des Embryos, weiß für die untere).

Die Rotationen treten in nahezu allen untersuchten Embryonen zum Teil mehrfach in unterschiedlicher Stärke auf. Meistens drehen sich die Zellen nur um wenige Grad, so dass die Zellkerntrajektorien insgesamt kaum beeinflusst werden (vgl. Kap. 3.1.2, die in Abb. A.1 dargestellten sind besonders ausgeprägte Beispiele). Eine Drehung der Zellanordnung um mehr als 45° konnte nicht beobachtet werden. Die Richtung der Drehungen folgt keinem erkennbaren Muster, d.h., die Rotationen erfolgen sowohl im als auch entgegen dem Uhrzeigersinn. Eine Rotation wird daher oftmals von der darauf folgenden annähernd kompensiert. Die Rotationen treten weiterhin zu beliebigen Stadien der Entwicklung auf, beginnend bereits im vierzelligen Zustand, d.h., sobald die Zellanordnung mindestens zweidimensional ist. Meist findet kurz vorher oder nachher eine oder mehrere Zellteilungen statt. Ebenso ist kein Einfluss der Temperatur zu erkennen: Rotationen treten bei allen untersuchten Umgebungstemperaturen auf. Die relative Anordnung der Zellen ändert sich bei diesen Rotationen nicht, da alle Zellen um den selben Winkel rotieren. Solche Ereignisse sollten daher keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung haben. Es ist bisher nicht gelungen, diese Rotationen auf eine stabile und eindeutige Art und Weise anhand des Trackings zu quantifizieren, ohne dass auch die Bewegung einzelner Zellen als solche (fehl-) klassifiziert wird.

Die Rotationen treten auf vergleichsweise kurzen Zeitskalen von (2-3)min auf. In einigen Publikationen wird zwar auch von Rotationen der gesamten Zellanordnung berichtet, jedoch sind die dort genannten Zeitskalen mit (30-100)min deutlich länger als die hier beobachteten [31, 52, 53, 100].

An dieser Stelle kann keine abschließende Begründung für dieses Phänomen angegeben werden. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass das gesamte Ei über das Deckgläschen rollt. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da in diesem Fall auch eine Verschiebung des Ei-Schwerpunktes erfolgen müsste. Eine solche wurde nicht detektiert. Es handelt sich somit um eine tatsächliche Rotation der Zellen innerhalb der Eihülle. Eine andere Möglichkeit stellt eine zeitabhängige oder dauerhafte Abweichung der Eihülle von einer rotati-

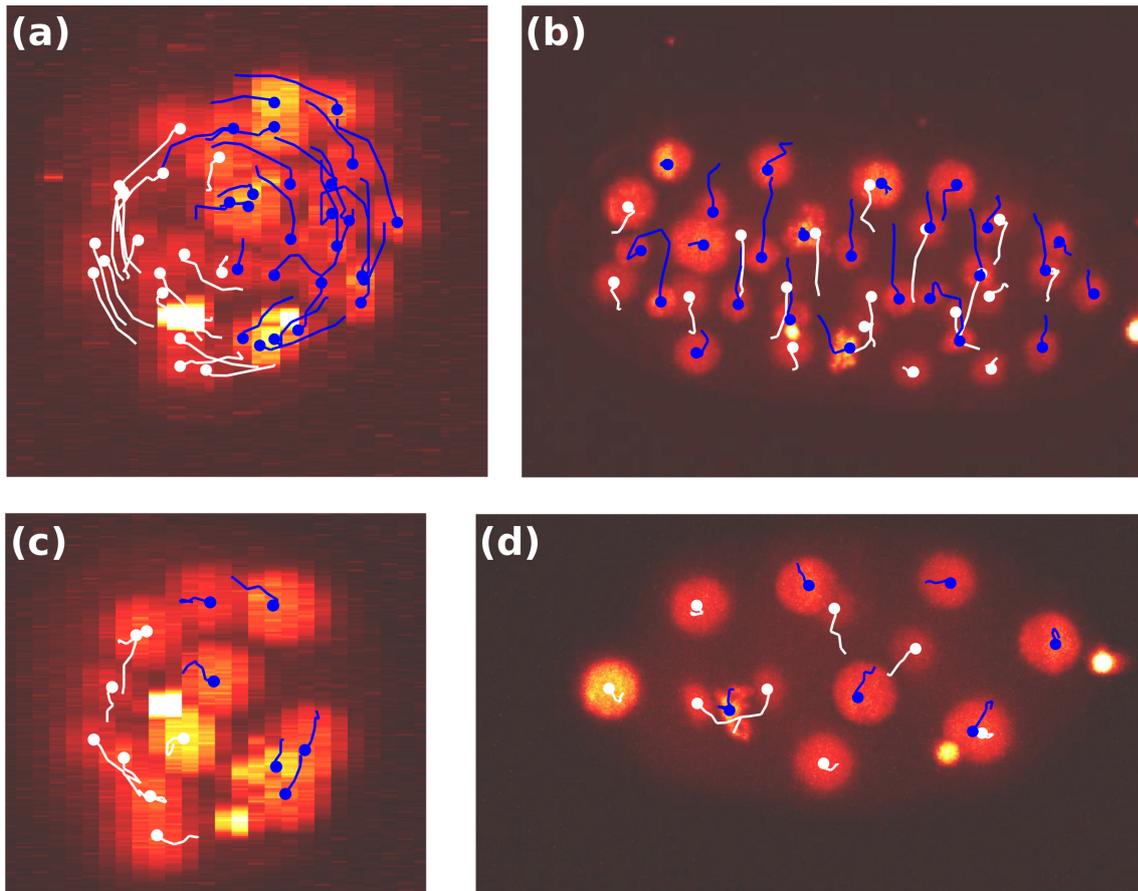


Abbildung A.1.: Embryonische Rotationen. (a-b) Maximumintensitätsprojektionen einer Aufnahme des Chromatin-Kanals in einem Embryo der Linie OD95 bei 22,5° unter der Kondition C27D9.1 (RNAi). (a) zeigt eine Projektion entlang der AP-Achse, (b) entlang einer dazu senkrechten. Der Embryo befindet sich im 43-zelligen Zustand. Der Aufnahme überlagert sind die getrackten Zellkerntrajektorien für die letzten 2,5 min (Punkte: aktuelle Position, Linien: vorheriger Pfad, blau: obere Hälfte des Embryos, weiß: untere Hälfte). Die Rotation aller Zellen um die AP-Achse ist deutlich zu erkennen. Der Embryo ist etwa 65 µm lang und 35 µm dick. (c-d) Wie (a-b). Embryo der Linie OD95 bei 22,5 °C, ungestörte Kondition, 14-zelliger Zustand. Der Embryo ist etwa 50 µm lang und 30 µm dick.

onselliptischen Form dar, so dass die Halbachsen senkrecht zur AP-Achse unterschiedliche Längen aufweisen. In diesem Fall sind auch die lokalen Krümmungen entlang des Umfangs des Eies unterschiedlich. Somit könnte es für bestimmte Zellen (z.B. während des *mitotic cell rounding*, vgl. Kap. A.2) günstig sein, entlang der Eihülle in Regionen zu wandern, in welchen die Krümmung der Eihülle jener der Zelle besser entspricht. In diesem Fall würde die Zellbewegung auf alle anderen übertragen. Ein solches Verhalten konnte jedoch mit dem Modell zur Zellanordnung bisher nicht reproduziert werden.

A.2. Mitotische Zellrundung

Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit mehrfach als sphärisch approximiert, vor allem während der Mitose (siehe z.B. Kap. 3.3). Die Annahme soll an dieser Stelle gerechtfertigt werden.

Während der *M*-Phase zeigen Zellen i.A. ein als mitotische Zellrundung (*mitotic cell rounding*) bezeichnetes Verhalten. Mit beginnender Mitose runden sich Zellen dabei ab

und nehmen während der Metaphase eine nahezu sphärische Gestalt an. Dieser Vorgang dient dazu, eine definierte Geometrie für verschiedene Vorgänge während der Mitose bereitzustellen, damit diese möglichst effizient ablaufen können (z.B. das Einfangen der kondensierten Chromosomen durch Kinetochormikrotubuli) [113]. Die Abrundung kann im Wesentlichen mittels zwei verschiedener Vorgänge erreicht werden [113]. Erstens können Zellen durch Regulierung ihrer Osmolarität schwellen. Bleibt gleichzeitig die Fläche ihrer Plasmamembran konstant, führt dies automatisch zu einer Rundung. Des Weiteren kann sich der Aktomyosinkortex versteifen. Dies führt zu einer globalen Minimierung der lokal vorhandenen Krümmung des Kortex und somit ebenso zu einem Abrunden der Zellen.

Mitotische Zellrundung ist vor allem in Kulturzellen untersucht. Dort befinden sich Zellen in Interphase typischerweise adhärent und in ausgebreiteter Gestalt am Boden des Kulturgefäßes (ein Beispiel ist die in Abb. 2.4c abgebildete Zelle). Während des Abrundens nimmt somit die von einer Zelle beanspruchte Fläche ab. Dies bedeutet, dass die Zellen selbst bei Konfluenz, d.h., bei vollständig mit Zellen bedecktem Boden des Gefäßes, bei ihrem Abrunden auf nahezu keinen Widerstand stoßen. In Embryonen von *C. elegans* ist dies fundamental anders, da Zellen hier zu allen Zeiten eine dreidimensionale Gestalt annehmen und von Nachbarzellen dicht umgeben sind. Zellen müssen somit Kräfte gegen ihre Nachbarn generieren, um sich abrunden zu können. Da dies bisher jedoch kaum untersucht wurde, ist nicht trivial klar, ob die eben angesprochene Annahme sphärischer Zellen (während der Mitose) gerechtfertigt ist.

An dieser Stelle soll daher die Form der Zellen als Funktion der Zeit untersucht werden. In Abb. A.2a sind die Zellformen für einen Embryo der Linie OD58 im vierzelligen Zustand gezeigt. Man erkennt deutlich ein Abrunden der Zelle *EMS*, bevor diese in Mitose eintritt. Zur Quantifizierung der Zellformen mittels eines skalaren Maßes bietet sich die sog. Aspherizität \mathcal{A} an, welche die Abweichung eines Objektes von einer Kugelgestalt misst. Sie wurde von Rudnick und Gaspari zur Beschreibung der Trajektorien diffundierender Teilchen eingeführt [232], kann jedoch auch ohne Weiteres für reale dreidimensionale Objekte verwendet werden. Zur Berechnung der Aspherizität einer Zelle wird deren Segmentierung herangezogen. Für einen Bildstapel zur Zeit t besteht diese aus N Voxeln an den Positionen $\mathbf{r}_n = (\mathbf{r}_{n,1}, \mathbf{r}_{n,2}, \mathbf{r}_{n,3}) = (\mathbf{x}_n, \mathbf{y}_n, \mathbf{z}_n)$ mit $n = 1, \dots, N$ (Koordinaten im Objektraum). Jedes dieser Voxeln wird nun als Einheitsmasse interpretiert, so dass daraus die Komponenten (i, j) des Trägheitstensors

$$\Theta_{i,j} = \sum_{n=1}^N (\mathbf{r}_n \cdot \mathbf{r}_n) \delta_{i,j} - r_{n,i} r_{n,j} \quad (\text{A.1})$$

mit dem Kronecker-Delta $\delta_{i,j}$ berechnet werden können. Die Eigenwerte des Trägheitstensors $\underline{\Theta}$ sind die Hauptträgheitsmomente $I_1 \leq I_2 \leq I_3$. Die Aspherizität ist schließlich definiert als

$$\mathcal{A} = \frac{\left(\sum_{i=1}^3 I_i\right)^2 - 3(I_1 I_2 + I_1 I_3 + I_2 I_3)}{\left(\sum_{i=1}^3 I_i\right)^2}. \quad (\text{A.2})$$

Für sphärische Objekte ist $I_1 = I_2 = I_3$ und es folgt $\mathcal{A} = 0$. Bei Formabweichungen wird $\mathcal{A} > 0$, für extrem elongierte Objekte gilt schließlich $\mathcal{A} \rightarrow 1$. Aufgrund der prinzipiell besseren Segmentierungsqualität werden hier Aufnahmen der Linie OD58 herangezogen. Darin wird für alle Zellen, deren gesamte Lebensdauer in den Aufnahmen enthalten ist, die Aspherizität \mathcal{A} als Funktion der Zeit berechnet. In Abb. A.2b sind die Ergebnisse für vier repräsentative Zellen (*ABp*, *EMS*, *ABpr* und *MS*) dargestellt. Es zeigt sich generell

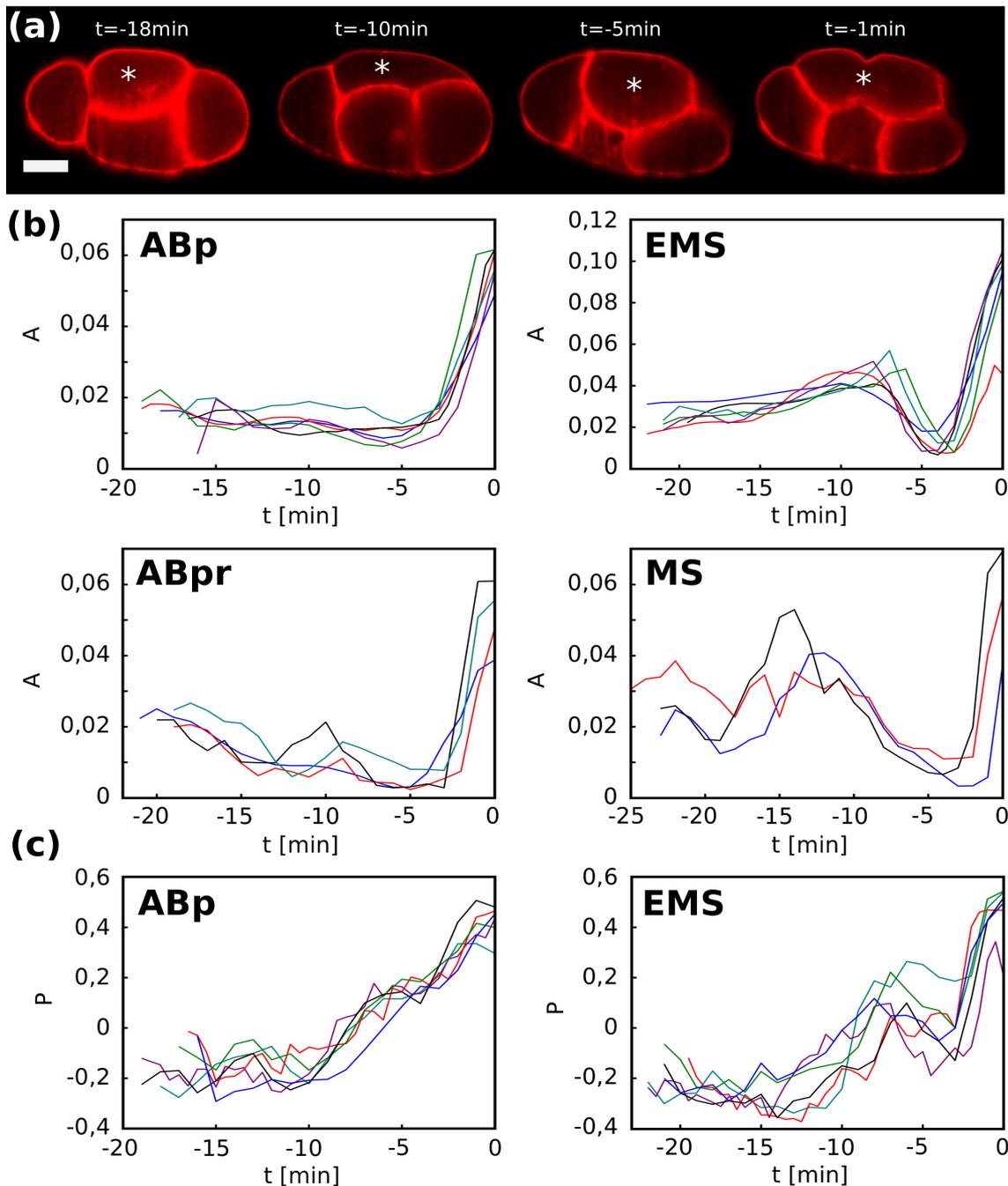


Abbildung A.2.: Mitotische Zellrundung in frühen Zellen. (a) Dargestellt sind einzelne Ebenen der Aufnahme eines Embryos der Linie OD58. *EMS* ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. $t = 0$ min ist auf das Ende der Cytokinese von *EMS* gelegt. Die Zelle rundet sich während ihrer Mitose bei $t = -5$ min deutlich ab. Vorher wird sie von ihren Nachbarn in eine stark abgeplattete Form gezwängt (bei $t = -10$ min). (b) Die Aspherizität gemäß Gl. A.2 ist für frühe Zellen in Embryonen der Linie OD58 als Funktion der Zeit dargestellt. Gezeigt sind die Daten für die Zellen *ABp* (oben links, $n = 6$ Embryonen), *EMS* (oben rechts, $n = 6$), *ABpr* (unten links, $n = 4$) und *ABpr* (unten rechts, $n = 3$; Abnahme von n , da Zellzyklen nicht vollständig in allen Aufnahmen enthalten sind). Der Zeitnullpunkt $t = 0$ min ist jeweils auf den Abschluss der Cytokinese gelegt. (c) Für die beiden Zellen *ABp* (links) und *EMS* (rechts) ist die Prolatheit gemäß Gl. A.3 für jeweils $n = 6$ Embryonen der Linie OD58 als Funktion der Zeit gezeigt (Zeitnullpunkt wie in (b)).

ein Absinken von \mathcal{A} bis etwa 5 min vor Ende des Zellzyklus (bei Linie OD58 definiert als abgeschlossene Cytokinese), bevor \mathcal{A} während der Telophase/Cytokinese stark ansteigt, da sich die Zelle elongiert. Insgesamt bedeutet dies, dass ein mitotisches Abrunden der Zellen in Embryonen des *C. elegans* ausgeprägt vorhanden ist. Die oben angesprochene Annahme ist somit gerechtfertigt.

Da \mathcal{A} nur über Abweichungen von einer Kugelgestalt Auskunft geben kann, jedoch nicht welcher Art diese Abweichungen sind, wird hier als zusätzliche Größe die Prolatheit \mathcal{P} definiert. Hiermit soll zwischen prolaten (langgestreckten) und oblaten (abgeplatteten) Formen unterschieden werden. Mit den oben definierten Hauptträgheitsmomenten ist

$$\mathcal{P} = 2\frac{I_2}{I_3} - \frac{I_1}{I_3} - 1. \quad (\text{A.3})$$

Für prolata Objekte gilt $I_3 \approx I_2 \gg I_1$, so dass $\mathcal{P} > 0$. Andererseits gilt bei oblaten Objekten $I_3 > I_2 \approx I_1$, d.h. $\mathcal{P} < 0$. Hingegen ist $\mathcal{P} = 0$ bei sphärischen Objekten ($I_1 = I_2 = I_3$) und $\mathcal{P} \approx 0$ bei Objekten, die weder klar prolata noch oblat sind ($2I_2 \approx I_1 + I_3$). Grenzwerte sind $\mathcal{P} \rightarrow 1$ für stark prolata und $\mathcal{P} \rightarrow -\frac{1}{2}$ für stark oblate Objekte (d.h. dünne Scheiben). Die Ergebnisse sind für zwei Zellen (*ABp* & *EMS*) in Abb. A.2c dargestellt. Sie können als repräsentativ für andere Zellen angesehen werden. Es zeigt sich, dass die typische Zellform vor der mitotischen Rundung oblat ist. Zur Zeit der maximalen Rundung zeigt \mathcal{P} einen Nulldurchgang, danach ist die Zelle prolata (Streckung während der Telophase).

Oben wurde angesprochen, dass das mitotische Runden u.a. dazu dient, ein effizientes Einfangen der Chromosomen durch die Kinetochormikrotubuli sicherzustellen [113]. Diese Feststellung baut darauf auf, dass in Zellen höher entwickelter Lebewesen die Disassemblierung der Kernmembran bereits vor dem vollständigen Aufbau der mitotischen Spindel erfolgt, die Chromosomen zum Einfangzeitpunkt also frei in der gesamten Zelle suspendiert sind [113]. Bei *C. elegans* erfolgt der Abbau der Kernmembran jedoch erst nachdem sich die Spindel gebildet hat, so dass ein (energieintensives) Abrunden zu diesem Zweck eigentlich unnötig wäre. Es kann daher vermutet werden, dass durch die Abrundung der Einfluss sterischer Effekte auf die Festlegung der Teilungsachsen minimiert werden soll (Hertwig'sche Regel, vgl. Kap. 4.2).

A.3. Implementierung der Simulation

Dieses Kapitel soll es Lesern mit Programmiererfahrung ermöglichen, die Simulation zu implementieren. Die mit den Simulationen erhaltenen Ergebnisse sind jedoch sämtlich Gegenstand von Kap. 3.6.

Der Code gliedert sich in zwei Abschnitte. Zuerst erfolgt eine Initialisierung, bei welcher alle relevanten Größen definiert werden. Daraufhin erfolgt die Positioniteration, d.h. die eigentliche Simulation der Zelltrajektorien.

Initialisierung. Zu Beginn werden alle freien Parameter definiert. Diese umfassen die Amplituden der Kräfte $F_{W,0}$ und $F_{C,0}$, den Zeitschritt Δt , die Eigröße (Ellipsoid mit den Halbachsen $L_{AP}/2$, $L_{DV}/2$, $L_{LR}/2$), die Varianz σ_ξ^2 des Rauschens der Zellbewegung sowie den Zellabstand nach Zellteilungen, λ . Des Weiteren werden die Parameter Δx der Spindelverschiebung zur Berechnung der Zellradien (incl. Varianz des Rauschens σ_ζ^2) sowie α und τ_M (linienabhängig) zur Bestimmung der Teilungszeiten benötigt. Die Werte dieser Parameter für eine ungestörte Simulation der Zellbewegung sind in Tabelle A.1 gesammelt (Parameter für die Simulation gestörter Fälle sind in Kap. 3.6 explizit angegeben).

Parameter	Wert
Zell-Zell-Wechselwirkung $F_{C,0}/\gamma$	0,1 $\mu\text{m}/\text{s}$
Zell-Eihülle-Wechselwirkung $F_{W,0}/\gamma$	0,2 $\mu\text{m}/\text{s}$
Zeitschritt Δt	2 s
Eigröße $L_{AP} \times L_{DV} \times L_{LR}$	$(50 \times 30 \times 30)\mu\text{m}^3$
Varianz σ_{ξ}^2 des Positionsrauschens	0,027 μm^2
Initialer Abstand von Schwesterzellen λ	300 nm
Spindelverschiebung Δx in P_0	2,35 $\mu\text{m} + \zeta$
Spindelverschiebung Δx in anderen Zellen	1,75 $\mu\text{m} + \zeta$
Varianz σ_{ζ}^2 des Verschiebungsrauschens	0,0225 μm^2

Tabelle A.1.: Simulationsparameter. Angegeben sind alle Parameter, die in den in dieser Arbeit beschriebenen Simulationen benutzt wurden, außer den linienabhängigen α und τ_M (siehe Tabelle 3.1 und Kap. 3.6) sowie den Teilungsachsen (siehe Tabelle A.2).

Das Koordinatensystem der Simulation wird so gelegt, dass die AP-Achse des Eies der x -Achse entspricht (positive Werte posterior). Die LR-Achse fällt mit der y -Achse, die DV-Achse mit der z -Achse zusammen (positive Werte dorsal bzw. rechts).

Die Berechnung des Abstandes einer Zelle von der Eihülle erfolgt nicht algebraisch, sondern numerisch. Hierzu wird die Eihülle durch eine Menge aus darauf liegenden Punkten \mathbf{q}_j approximiert. Die \mathbf{q}_j haben voneinander einen Abstand von 20 nm und werden mithilfe der Ellipsengleichung $(2x/L_{AP})^2 + (2y/L_{LR})^2 + (2z/L_{DV})^2 = 1$ erzeugt. Für ein Ei der in Tabelle A.1 genannten Größe besteht die Eihülle aus 75802 Punkten.

Des Weiteren muss die Lookup-Tabelle für die Zellteilungsachsen definiert werden. Diese Tabelle dient gleichzeitig der Vorgabe des Abstammungsbaums aller simulierten Zellen. Die Daten werden in der Variablen `divisionfacts` abgespeichert. Diese enthält für jede sich teilende Zelle ein Feld, in welchem der Name der Zelle, die Namen beider Tochterzellen T_1 und T_2 sowie die Teilungsachse \mathbf{d} als normierter Einheitsvektor abgespeichert sind (zur Bestimmung der Vektoren \mathbf{d} siehe Kap. 3.6, \mathbf{d} zeigt in Richtung der Tochterzelle T_1). Die jeweiligen Vektoren \mathbf{d} sind in Tabelle A.2 für alle simulierten Zellteilungen gesammelt. In `divisionfacts` werden keine Informationen über Teilungszeitpunkte oder Teilungsverhältnisse abgelegt.

In der Simulation werden die Informationen der aktuell vorhandenen Zellen in einer weiteren Variablen, `nuclei`, gespeichert. Für jede Zelle i wird in `nuclei` deren Name, die aktuelle Position \mathbf{r}_i , die Namen aller Vorgängerzellen (Genealogie), deren Radius R_i und die Teilungszeit τ_i abgespeichert. Zudem muss als boolescher Wert ψ vermerkt werden, ob die Zelle als größere Tochterzelle aus einer Teilung hervorgegangen ist (vgl. Kap. 3.6). Auf die Berechnung der einzelnen Werte wird weiter unten eingegangen.

Die Variable `nuclei` wird vor Beginn der Positionsiteration initialisiert, wobei die einzige vorhandene Zelle P_0 ist. Deren Radius wird so gewählt, dass das zugehörige Kugelvolumen dem der Eihülle entspricht: $R_{P_0} = (\frac{1}{8}L_{AP}L_{DV}L_{LR})^{1/3}$. Die initiale Position von P_0 ist im Zentrum des Eies, $\mathbf{r}_{P_0} = (0, 0, 0)$. Die Teilungszeit dieser Zelle wird auf $\tau_{P_0} = 1$ s festgelegt. Der Wert von ψ wird für P_0 auf 0 gesetzt (nicht als größere Tochterzelle aus einer Teilung hervorgegangen).

Die Initialisierung ist damit abgeschlossen. Mit t wird im Folgenden die Zeit ab Beginn der Simulation bei $t = 0$ s bezeichnet. Die Teilungszeiten τ_i geben eine absolute Zeit an und sind nicht mit den Zellzyklendauern zu verwechseln.

Zelle	Teilungsachse d	Zelle	Teilungsachse d
$P0$	$[-1, 000; 0, 000; 0, 000]$	$ABar$	$[-0, 539; 0, 270; -0, 798]$
$P1$	$[-0, 941; 0, 036; -0, 337]$	$ABpl$	$[-0, 748; 0, 252; 0, 614]$
$P2$	$[-0, 503; 0, 035; 0, 864]$	$ABpr$	$[-0, 591; 0, 678; 0, 438]$
$P3$	$[0, 070; -0, 168; 0, 983]$	$ABala$	$[-0, 460; 0, 454; -0, 763]$
EMS	$[-0, 975; 0, 177; -0, 131]$	$ABalp$	$[-0, 460; 0, 454; -0, 763]$
MS	$[-0, 881; -0, 272; -0, 387]$	$ABara$	$[-0, 957; -0, 043; -0, 286]$
E	$[-0, 843; 0, 272; -0, 465]$	$ABarp$	$[-0, 947; 0, 321; -0, 030]$
C	$[-0, 939; -0, 238; -0, 247]$	$ABpla$	$[-0, 960; 0, 279; -0, 029]$
AB	$[-0, 725; 0, 103; -0, 681]$	$ABplp$	$[-0, 966; 0, 053; -0, 253]$
ABa	$[-0, 112; -0, 991; -0, 073]$	$ABprp$	$[-0, 898; 0, 360; -0, 254]$
ABp	$[-0, 088; -0, 996; 0, 031]$	$ABpra$	$[-0, 918; 0, 328; -0, 224]$
$ABal$	$[-0, 392; 0, 136; 0, 910]$		

Tabelle A.2.: Verwendete Zellteilungsachsen. Die Einträge geben die gemäß Gl. A.4 verwendeten normierten Zellteilungsachsen für alle 23 sich in der Simulation teilenden Zellen an (x, y, z -Werte, Koordinatensystem wie beschrieben). Die Bestimmung erfolgt wie in Kap. 3.6 erläutert.

Positionsiteration. Die Zelltrajektorien werden iterativ berechnet. Die erste Iteration findet bei $t = 0$ s statt. Für jede weitere Iteration wird t um Δt erhöht. Die Simulation endet per Definition 300 s, nachdem der 24-zellige Zustand erreicht ist.

Zu Beginn jeder Iteration wird getestet, ob Zellteilungen auftreten. Dies ist dann der Fall, wenn für eine oder mehrere Zellen die Bedingung $t - \Delta t < \tau_i \leq t$ erfüllt ist. Für jede sich teilende Zelle i wird deren Eintrag in `nuclei` entfernt. Neue Einträge für ihre beiden Tochterzellen werden angelegt. Aus der aktuellen Position der Mutterzelle i , \mathbf{r}_i , können die der Tochterzellen gemäß

$$\mathbf{r}_{T1/T2} = \mathbf{r}_i \pm \frac{\lambda}{2} \mathbf{d}_i \quad (\text{A.4})$$

bestimmt werden. Die Teilungsachse \mathbf{d}_i wird aus `divisionfacts` ausgelesen, ebenso wie die Namen der Tochterzellen $T1$ und $T2$. Die Radien der beiden neuen Zellen werden gemäß Gl. 3.36, Gl. 3.37 und Gl. 3.38 bestimmt (Umrechnung des Volumens in einen Radius unter der Annahme einer Kugelgestalt). Die zu verwendende Spindelverschiebung kann mittels der Parameter ψ bestimmt werden (vgl. Fallunterscheidung in Gl. 3.38). Die Reihenfolge von $T1$ und $T2$ in `divisionfacts` ist dergestalt, dass $T1$ immer die anteriore/somatische Tochterzelle, $T2$ die posteriore/Keimbahnzelle ist (vgl. Definition des Teilungsverhältnisses TV in Kap. 3.3). Den beiden neuen Zellen müssen Parameter ψ zugeordnet werden. Hier gilt $\psi_{T1} = 1$ und $\psi_{T2} = 0$, wenn für die aktuell teilende Zelle $\psi_i = 0$ war, und $\psi_{T1} = \psi_{T2} = 1$, wenn $\psi_i = 1$ gilt. Schließlich müssen den neuen Zellen noch ihre Teilungszeiten τ_i zugewiesen werden. Dies erfolgt gemäß Gl. 3.39, wobei die korrekten, linienspezifischen Parameter α und τ_M verwendet werden müssen (die Linienzugehörigkeit kann anhand des Zellnamens bestimmt werden).

Anschließend folgt die eigentliche Positionsiteration. Die Variable `nuclei` wird in eine temporäre Variable `nuclei_old` kopiert. Die Einträge von `nuclei_old` werden nun verwendet, um die Koordinaten in `nuclei` zu aktualisieren. Diese Aktualisierung erfolgt für alle vorhandenen Zellen sequenziell. Für die Zelle i wird zuerst die Kraft $\mathbf{F}_W(\mathbf{r}_i)$ gemäß Gl. 1.2 bestimmt. $\mathbf{F}_W(\mathbf{r}_i)$ hängt vom Abstand a_i der Zelle zur Eihülle ab. Daher wird für jeden der oben definierten Rasterpunkte \mathbf{q}_j der Abstand zur aktuellen Zellposition \mathbf{r}_i

berechnet. Derjenige Punkt \mathbf{q}_j , für den $a_i = |\mathbf{r}_i - \mathbf{q}_j|$ minimal wird, wird zur Berechnung von $\mathbf{F}_W(\mathbf{r}_i)$ gemäß Gl. 1.2 verwendet. Weiterhin werden die Kräfte aller anderen Zellen $k \neq i$ auf i gemäß Gl. 1.3 berechnet. Dies ist mit den in `nuclei_old` gespeicherten Größen direkt möglich. Schließlich muss noch eine zufällige Positionsschwankung $\boldsymbol{\xi}$ generiert werden. Hierzu wird ein Einheitsvektor \mathbf{e}_ξ generiert, der eine zufällige, gleichverteilte Richtung angibt. Zudem wird eine zufällige Schrittweite d_ξ erzeugt. Die d_ξ folgen einer Gaußverteilung mit $\langle d_\xi \rangle = 0$ und der parametrisch vorgegebenen Varianz σ_ξ^2 . Damit ist $\boldsymbol{\xi}_i = d_\xi \mathbf{e}_\xi$. Die neuen Koordinaten der Zelle i können nun gemäß Gl. 1.1 berechnet und in `nuclei` abgespeichert werden.

Die Variable `nuclei` wird für jede Iteration in einer weiteren Variable `results` abgespeichert. Somit sind nach Beendigung der Simulation die Zellpositionen zu allen Zeiten bekannt. Zusammen mit den abgespeicherten Namen und Genealogien der Zellen lassen sich damit die Koordinatenmatrizen `coordinates` rekonstruieren, so dass die simulierten Trajektorien in derselben Form wie die Trackingergebnisse vorliegen (vgl. Kap. 2.2.1).

Abkürzungsverzeichnis

- AOTF** *Acousto-optical tunable filter*, akustooptischer Modulator
- AP** Anterior-posterior
- AR** *Aspect ratio*, Aspekteverhältnis
- C. elegans** *Caenorhabditis elegans*
- DIC** *differential interference contrast*, Differentialinterferenzkontrast
- DNA** *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
- DSLIM** *Digital scanned laser light-sheet fluorescence microscope*, digital gescanntes Lichtblattmikroskop
- dsRNA** *double-stranded RNA*, Doppelstrang-RNA
- DV** Dorsal-ventral
- EEM** Extra-embryonale Matrix
- FWHM** *Full width at half maximum*, Halbwertsbreite
- GFP** *Green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein
- GUI** *Graphical user interface*, graphische Benutzeroberfläche
- IC** *Intersystem-crossing*, Interkombination
- INM** *Inner nuclear membrane*, innere Kernmembran
- iSPIM** *Inverted selective plane illumination microscopy*, invertierte Lichtblattmikroskopie
- KPR** Kern-Plasma-Relation
- LR** Links-rechts
- MIP** *maximum intensity projection*, Maximumintensitätsprojektion
- MPF** *mitosis/maturation-promoting factor*, M-Phase-Förderfaktor

NEBD *Nuclear envelope breakdown*, Zusammenbruch der Kernmembran

NPC *Nuclear pore complex*, Kernpore

ONM *Outer nuclear membrane*, äußere Kernmembran

PSF *Point spread function*, Punktspreizfunktion

RNA *Ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure

RNAi RNA-Interferenz

sCMOS *Scientific complementary metal-oxide-semiconductor*, wissenschaftlicher, sich ergänzender Metalloxid-Halbleiter

SPIM *Selective plane illumination microscopy*, Lichtblattmikroskopie

Abbildungsverzeichnis

1.1. Zeitreihe zweier sich entwickelnder <i>Caenorhabditis elegans</i> Embryonen	4
1.2. Die eukaryotische Zelle	6
1.3. Stadien des eukaryotischen Zellzyklus	8
1.4. <i>C. elegans</i> und sein Lebenszyklus	10
1.5. Zelllinien und Zellanordnungen bis zur Gastrulation	12
1.6. Modellierung der Zellbewegung während der frühen Embryogenese	16
1.7. Ergebnisse der Modellierung der Zellbewegung	18
1.8. Weiterentwicklung des Modells durch Yamamoto und Kimura	20
1.9. Jablonski-Diagramm, Absorptions- und Emissionsspektren	23
1.10. Prinzipieller Aufbau eines SPIM und Vorteile gegenüber anderen Mikroskopen	27
1.11. Setup des verwendeten Lichtblattmikroskops	28
2.1. Exemplarische Aufnahmen der drei verwendeten transgenen Wurmlinien . . .	34
2.2. Stabilitätstest der verwendeten Korrelationskoeffizienten	44
2.3. Probleme und schematische Übersicht der Membransegmentierung	47
2.4. Ergebnisse des Segmentierungsalgorithmus	50
2.5. Segmentierung der Zellkerne	52
3.1. Zeitabhängige End-zu-End-Abstände der Zellkerntrajektorien	59
3.2. Aufnahmen von Embryonen ohne starre Chitinhülle	62
3.3. Korrelationen der Zellanordnungen in verschiedenen Embryonen	63
3.4. Zeitaufgelöste Bestimmung der Zellvolumina	65
3.5. Güte der Volumenbestimmung	67
3.6. Einfluss induzierter Störungen auf das embryonale Gesamtvolumen	68
3.7. Abschätzung des nicht signifikanten Bereiches der Teilungsverhältnisse . . .	73
3.8. Asymmetrien der Zellteilungen in ungestörten Embryonen	74
3.9. Asymmetrien der Zellteilungen in Embryonen ohne starre Eihülle	76
3.10. Spindelverschiebungen somatischer Zellteilungen	78
3.11. Konstante Spindelverschiebung erklärt Asymmetrien der Keimbahnzellen .	81
3.12. SPIM-Aufnahmen bestätigen zellgrößenunabhängige Spindelverschiebung .	83
3.13. Zeitabhängige Messung der Spindelverschiebung in der Zygote	86
3.14. Modell zur Erklärung der konstanten Spindelverschiebung	88
3.15. Zeitliche Entwicklung der Zellkernvolumina	99
3.16. Nukleusvolumina und Kern-Plasma-Relationen am Ende der Interphase . .	101

3.17. Exponentielle Fits beschreiben zeitabhängige Nukleusvolumen	102
3.18. Abhängigkeit der Fitparameter vom Zellvolumen	103
3.19. Skalierung der Nukleusvolumina und KPR im Langzeitlimit	105
3.20. Temperaturabhängige Messung der Wachstumsdynamik	106
3.21. Linearer Zusammenhang zwischen τ und der quadrierten cytoplasmischen Dicke	109
3.22. Volumen- und Temperaturabhängigkeit von τ_{P-A}	119
3.23. Zusammenhang zwischen Zellvolumina und Zellzyklendauern	122
3.24. Zusammenhang zwischen Zellverdopplungsdauer und embryonalem Gesamt- volumen	125
3.25. Zellzyklendauern im Generationsmittel in gestörten Embryonen	126
3.26. Aufspaltung der Zellzyklendauern innerhalb einer Zellgeneration	127
3.27. Temperaturabhängigkeit der Zellzyklendauer	130
3.28. Schema des Modells limitierender Komponenten	132
3.29. Zellzyklendauern späterer Zellgenerationen	137
3.30. Ablaufdiagramm der Simulation zur Zellanordnung	145
3.31. Experimentelle und simulierte Zellvolumina und Zellzyklendauern	148
3.32. Vergleich der Simulationen mit Trackingergebnissen	149
3.33. Vergleich Parameter-reduzierter Simulationen mit Trackingergebnissen	151
3.34. Zellvolumina und -zyklendauern bei Störungen	153
3.35. Vergleich der Simulationen unter Störungen mit Trackingergebnissen	155
3.36. Fehlerrate bei graduell erhöhter Störung	156
3.37. Entstehung zweier Phänotypen	157
4.1. Monte-Carlo-Simulationen & Gastrulation	164
A.1. Embryonische Rotationen	168
A.2. Mitotische Zellrundung in frühen Zellen	170

Tabellenverzeichnis

1.2. Simulationsparameter (alt)	18
2.1. Typische Aufnahmeparameter	35
3.1. Zelllinienabhängige Fitparameter der Gl. 3.22	123
A.1. Simulationsparameter (aktuell)	172
A.2. Verwendete Zellteilungsachsen	173

- [1] R. Fickentscher. *Dreidimensionale Rekonstruktion biologischer Proben mittels zeitaufgelöster Lichtblattmikroskopie*. Diplomarbeit. Universität Bayreuth, Lehrstuhl Experimentalphysik 1, 2013.
- [2] R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss. *Mechanical cues in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**. *Biophys J* **105** (2013), S. 1805–1811.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts und P. Walter. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2014.
- [4] Bowerman, B., *Lab website*, <http://molbio.uoregon.edu/bowerman/> Zugriff: 30.09.2017.
- [5] G. Salbreux, G. Charras und E. Paluch. *Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis*. *Trends Cell Biol* **22** (2012), S. 536–545.
- [6] A. I. Lamond und W. C. Earnshaw. *Structure and function in the nucleus*. *Science* **280** (1998), S. 547–553.
- [7] D. Görlich und U. Kutay. *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15** (1999), S. 607–660.
- [8] R. D. Goldman, Y. Gruenbaum, R. D. Moir, D. K. Shumaker und T. P. Spann. *Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture*. *Genes Dev* **16** (2002), S. 533–547.
- [9] Y. Gruenbaum und R. Foisner. *Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation*. *Annu Rev Biochem* **84** (2015), S. 131–164.
- [10] R. N. Mukherjee, P. Chen und D. L. Levy. *Recent advances in understanding nuclear size and shape*. *Nucleus* **7** (2016), S. 167–186.
- [11] G. Karp. *Molekulare Zellbiologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [12] L. G. Edgar und J. D. McGhee. *DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans**. *Cell* **53** (1988), S. 589–599.
- [13] J. E. Sulston und H. R. Horvitz. *Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans**. *Dev Biol* **56** (1977), S. 110–156.
- [14] F. J. McNally. *Mechanisms of spindle positioning*. *J Cell Biol* **200** (2013), S. 131–140.
- [15] S. W. Grill und A. A. Hyman. *Spindle positioning by cortical pulling forces*. *Dev Cell* **8** (2005), S. 461–465.
- [16] S. Grill. *The mechanics of asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo*. Diss. Technische Universität München, Physik-Department, Lehrstuhl für Biophysik E22, 2002.

- [17] K. K. Lee, Y. Gruenbaum, P. Spann, J. Liu und K. L. Wilson. *C. elegans nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis*. Mol Biol Cell **11** (2000), S. 3089–3099.
- [18] R. Rappaport. *Cytokinesis in animal cells*. Int Rev Cytol **31** (1971), S. 169–213.
- [19] H. Bringmann und A. A. Hyman. *A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals*. Nature **436** (2005), S. 731–734.
- [20] L. Rose und P. Gönczy. *Polarity establishment, asymmetric division and segregation of fate determinants in early C. elegans embryos*. WormBook: the online review of C. elegans biology (2014).
- [21] A. Carvalho, A. Desai und K. Oegema. *Structural memory in the contractile ring makes the duration of cytokinesis independent of cell size*. Cell **137** (2009), S. 926–937.
- [22] T. Bongers und H. Ferris. *Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring*. Trends Ecol Evol **14** (1999), S. 224–228.
- [23] R. A. Ankeny. *The natural history of Caenorhabditis elegans research*. Nat Rev Genet **2** (2001), S. 474–479.
- [24] S. Brenner. *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics **77.1** (1974), S. 71–94.
- [25] C. elegans Sequencing Consortium. *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science **282** (1998), S. 2012–2018.
- [26] *Caenorhabditis Genetics Center*, University of Minnesota, <https://cgc.umn.edu>.
- [27] J. Hodgkin und T. Doniach. *Natural variation and copulatory plug formation in Caenorhabditis elegans*. Genetics **146** (1997), S. 149–164.
- [28] *WormAtlas*, Altun, Z.F., Herndon, L.A., Wolkow, C.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. (ed.s) 2002-2018. <http://www.wormatlas.org>.
- [29] U. Deppe, E. Schierenberg, T. Cole, C. Krieg, D. Schmitt, B. Yoder und G. von Ehrenstein. *Cell lineages of the embryo of the nematode Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A **75** (1978), S. 376–380.
- [30] J. Kimble und D. Hirsh. *The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol **70** (1979), S. 396–417.
- [31] J. E. Sulston, E. Schierenberg, J. G. White und J. N. Thomson. *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol **100** (1983), S. 64–119.
- [32] O. Hobert. *Neurogenesis in the nematode Caenorhabditis elegans*. WormBook: the online review of C. elegans biology (2010).
- [33] J. J. Collins, C. Huang, S. Hughes und K. Kornfeld. *The measurement and analysis of age-related changes in Caenorhabditis elegans*. WormBook: the online review of C. elegans biology (2008).
- [34] R. D. Nath, E. S. Chow, H. Wang, E. M. Schwarz und P. W. Sternberg. *C. elegans Stress-Induced Sleep Emerges from the Collective Action of Multiple Neuropeptides*. Curr Biol **26** (2016), S. 2446–2455.
- [35] E. L. Ardiel und C. H. Rankin. *An elegant mind: learning and memory in Caenorhabditis elegans*. Learning & Memory **17** (2010), S. 191–201.

- [36] A. K. Corsi, B. Wightman und M. Chalfie. *A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans*. Genetics **200** (2015), S. 387–407.
- [37] E. T. Kipreos. *C. elegans cell cycles: invariance and stem cell divisions*. Nat Rev Mol Cell Biol **6** (2005), S. 766–776.
- [38] K. K. Stein und A. Golden. *The C. elegans eggshell*. WormBook: the online review of C. elegans biology (2015).
- [39] Y. Zhang, J. M. Foster, L. S. Nelson, D. Ma und C. K. S. Carlow. *The chitin synthase genes chs-1 and chs-2 are essential for C. elegans development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively*. Dev Biol **285** (2005), S. 330–339.
- [40] S. K. Olson, G. Greenan, A. Desai, T. Müller-Reichert und K. Oegema. *Hierarchical assembly of the eggshell and permeability barrier in C. elegans*. J Cell Biol **198** (2012), S. 731–748.
- [41] E. Schierenberg und W. B. Wood. *Control of cell-cycle timing in early embryos of Caenorhabditis elegans*. Dev Biol **107** (1985), S. 337–354.
- [42] L. S. Rose und K. J. Kemphues. *Early patterning of the C. elegans embryo*. Annu Rev Genet **32** (1998), S. 521–545.
- [43] D. Hirsh, D. Oppenheim und M. Klass. *Development of the reproductive system of Caenorhabditis elegans*. Dev Biol **49** (1976), S. 200–219.
- [44] S. Q. Schneider und B. Bowerman. *Cell polarity and the cytoskeleton in the Caenorhabditis elegans zygote*. Annu Rev Genet **37** (2003), S. 221–249.
- [45] N. W. Goehring, P. K. Trong, J. S. Bois, D. Chowdhury, E. M. Nicola, A. A. Hyman und S. W. Grill. *Polarization of PAR proteins by advective triggering of a pattern-forming system*. Science **334** (2011), S. 1137–1141.
- [46] K. Kemphues und S. Strome. „Fertilization and establishment of polarity in the embryo“. *C. elegans II. 2nd edition*. Hrsg. von D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess. Cold Spring Harbor, NY, 1997. Kap. 13, S. 335–359.
- [47] C. C. Mello, B. W. Draper und J. R. Priess. *The maternal genes apx-1 and glp-1 and establishment of dorsal-ventral polarity in the early C. elegans embryo*. Cell **77** (1994), S. 95–106.
- [48] J. R. Priess. *Establishment of initial asymmetry in early Caenorhabditis elegans embryos*. Curr Opin Genet Dev **4** (1994), S. 563–568.
- [49] D. C. Bergmann, M. Lee, B. Robertson, M.-F. B. Tsou, L. S. Rose und W. B. Wood. *Embryonic handedness choice in C. elegans involves the Galpha protein GPA-16*. Development **130** (2003), S. 5731–5740.
- [50] S. Schonegg, A. A. Hyman und W. B. Wood. *Timing and mechanism of the initial cue establishing handed left–right asymmetry in Caenorhabditis elegans embryos*. Genesis **52** (2014), S. 572–580.
- [51] J. Nance, J.-Y. Lee und B. Goldstein. *Gastrulation in C. elegans*. WormBook: the online review of C. elegans biology (2005), S. 1–13.
- [52] J. Hench, J. Henriksson, M. Lüppert und T. R. Bürglin. *Spatio-temporal reference model of Caenorhabditis elegans embryogenesis with cell contact maps*. Dev Biol **333** (2009), S. 1–13.

- [53] R. Schnabel, H. Hutter, D. Moerman und H. Schnabel. *Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification*. Dev Biol **184** (1997), S. 234–265.
- [54] J. L. Richards, A. L. Zacharias, T. Walton, J. T. Burdick und J. I. Murray. *A quantitative model of normal *Caenorhabditis elegans* embryogenesis and its disruption after stress*. Dev Biol **374** (2013), S. 12–23.
- [55] G. Seydoux und A. Fire. *Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans**. Development **120** (1994), S. 2823–2834.
- [56] G. Seydoux, C. C. Mello, J. Pettitt, W. B. Wood, J. R. Priess und A. Fire. *Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans**. Nature **382** (1996), S. 713–716.
- [57] I. E. Schauer und W. B. Wood. *Early *C. elegans* embryos are transcriptionally active*. Development **110** (1990), S. 1303–1317.
- [58] L. G. Edgar, N. Wolf und W. B. Wood. *Early transcription in *Caenorhabditis elegans* embryos*. Development **120** (1994), S. 443–451.
- [59] J. A. Powell-Coffman, J. Knight und W. B. Wood. *Onset of *C. elegans* gastrulation is blocked by inhibition of embryonic transcription with an RNA polymerase antisense RNA*. Dev Biol **178** (1996), S. 472–483.
- [60] E. D. Newman-Smith und J. H. Rothman. *The maternal-to-zygotic transition in embryonic patterning of *Caenorhabditis elegans**. Curr Opin Genet Dev **8** (1998), S. 472–480.
- [61] K. Yamamoto und A. Kimura. *An asymmetric attraction model for the diversity and robustness of cell arrangement in nematodes*. Development **144.23** (2017), S. 4437–4449.
- [62] J.-Y. Lee und B. Goldstein. *Mechanisms of cell positioning during *C. elegans* gastrulation*. Development **130** (2003), S. 307–320.
- [63] K. Alim. *Being Squeezed into the Right Place within the Egg Shell*. Biophys J **105** (2013), S. 1735–1736.
- [64] S. Reinsch und P. Gönczy. *Mechanisms of nuclear positioning*. J Cell Sci **111** (1998), S. 2283–2295.
- [65] J. Schulze und E. Schierenberg. *Evolution of embryonic development in nematodes*. EvoDevo **2** (2011), S. 18.
- [66] B. Goldstein. *On the evolution of early development in the Nematoda*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356** (2001), S. 1521–1531.
- [67] U. Kubitscheck. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. John Wiley & Sons, 2017.
- [68] G. Shah, M. Weber und J. Huisken. „Light Sheet Microscopy“. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. Hrsg. von U. Kubitscheck. John Wiley & Sons, 2017. Kap. 7, S. 243–266.
- [69] *Fluorescence Spectra Viewer*, ThermoFisher Scientific, www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.
- [70] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Hrsg. von J. R. Lakowicz. Springer US, 2006.

- [71] J. W. Lichtman und J.-A. Conchello. *Fluorescence microscopy*. Nat Methods **2** (2005), S. 910–919.
- [72] T. Wilson. *Spinning-disk microscopy systems*. Cold Spring Harbor protocols **2010** (2010).
- [73] H. Siedentopf und R. Zsigmondy. *Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser*. Annalen der Physik **315** (1902), S. 1–39.
- [74] A. H. Voie, D. H. Burns und F. A. Spelman. *Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens*. J Microsc **170** (1993), S. 229–236.
- [75] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt und E. H. K. Stelzer. *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*. Science **305** (2004), S. 1007–1009.
- [76] J. Huisken und D. Y. R. Stainier. *Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology*. Development **136** (2009), S. 1963–1975.
- [77] R. M. Power und J. Huisken. *A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging*. Nat Methods **14** (2017), S. 360–373.
- [78] P. A. Santi. *Light sheet fluorescence microscopy: a review*. J Histochem Cytochem **59** (2011), S. 129–138.
- [79] F. Strobl, A. Schmitz und E. H. K. Stelzer. *Improving your four-dimensional image: traveling through a decade of light-sheet-based fluorescence microscopy research*. Nat Protoc **12** (2017), S. 1103–1109.
- [80] P. J. Keller und E. H. K. Stelzer. *Quantitative in vivo imaging of entire embryos with Digital Scanned Laser Light Sheet Fluorescence Microscopy*. Curr Opin Neurobiol **18** (2008), S. 624–632.
- [81] Y. Wu, A. Ghitani, R. Christensen, A. Santella, Z. Du, G. Rondeau, Z. Bao, D. Colón-Ramos und H. Shroff. *Inverted selective plane illumination microscopy (iSPIM) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A **108** (2011), S. 17708–17713.
- [82] Krieger, J., *Lichtscheibenmikroskopie*, <https://de.wikipedia.org/wiki/Lichtscheibenmikroskopie>.
- [83] M. Schaub. *Aufbau eines Lichtblattmikroskops (SPIM)*. Diplomarbeit. Universität Bayreuth, Lehrstuhl Experimentalphysik 1, 2012.
- [84] P. Struntz. *Automatisierung und Charakterisierung eines Lichtblattmikroskops zur Beobachtung entwicklungsbiologischer Modellsysteme*. Diplomarbeit. Universität Bayreuth, Lehrstuhl Experimentalphysik 1, 2013.
- [85] P. Struntz. *Quantitative Beobachtung dynamischer Prozesse im frühen C. elegans Embryo*. Dissertation, in Vorbereitung. Universität Bayreuth, Lehrstuhl Experimentalphysik 1, 2018.
- [86] K. Greger, J. Swoger und E. H. K. Stelzer. *Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope*. Rev Sci Instrum **78** (2007), S. 023705.
- [87] P. J. Verveer, J. Swoger, F. Pampaloni, K. Greger, M. Marcello und E. H. K. Stelzer. *High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy*. Nat Methods **4** (2007), S. 311–313.

- [88] P. J. Keller, A. D. Schmidt, J. Wittbrodt und E. H. K. Stelzer. *Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy*. *Science* **322** (2008), S. 1065–1069.
- [89] P. Askjaer, V. Galy, E. Hannak und I. W. Mattaj. *Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos*. *Mol Biol Cell* **13** (2002), S. 4355–4370.
- [90] A. Audhya, F. Hyndman, I. X. McLeod, A. S. Maddox, J. R. Yates, A. Desai und K. Oegema. *A complex containing the *Sm* protein *CAR-1* and the RNA helicase *CGH-1* is required for embryonic cytokinesis in *Caenorhabditis elegans**. *J Cell Biol* **171** (2005), S. 267–279.
- [91] K. McNally, A. Audhya, K. Oegema und F. J. McNally. *Katanin controls mitotic and meiotic spindle length*. *J Cell Biol* **175** (2006), S. 881–891.
- [92] T. Stiernagle. *Maintenance of *C. elegans**. WormBook: the online review of *C. elegans* biology (2006).
- [93] J. Ahringer. *Reverse genetics*. WormBook: the online review of *C. elegans* biology (2006).
- [94] N. Wolf, J. Priess und D. Hirsh. *Segregation of germline granules in early embryos of *Caenorhabditis elegans*: an electron microscopic analysis*. *J Embryol Exp Morphol* **73** (1983), S. 297–306.
- [95] B. Goldstein. *Cell contacts orient some cell division axes in the *Caenorhabditis elegans* embryo*. *J Cell Biol* **129** (1995), S. 1071–1080.
- [96] A. A. Hyman und J. G. White. *Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans**. *J Cell Biol* **105** (1987), S. 2123–2135.
- [97] S. Zhang und J. R. Kuhn. *Cell isolation and culture*. WormBook: the online review of *C. elegans* biology (2013).
- [98] Z. Bao, J. I. Murray, T. Boyle, S. L. Ooi, M. J. Sandel und R. H. Waterston. *Automated cell lineage tracing in *Caenorhabditis elegans**. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006), S. 2707–2712.
- [99] J. I. Murray, Z. Bao, T. J. Boyle und R. H. Waterston. *The lineaging of fluorescently-labeled *Caenorhabditis elegans* embryos with *StarryNite* and *AceTree**. *Nat Protoc* **1** (2006), S. 1468–1476.
- [100] T. J. Boyle, Z. Bao, J. I. Murray, C. L. Araya und R. H. Waterston. *AceTree: a tool for visual analysis of *Caenorhabditis elegans* embryogenesis*. *BMC Bioinf* **7** (2006), S. 275.
- [101] S. Uppaluri, S. C. Weber und C. P. Brangwynne. *Hierarchical Size Scaling during Multicellular Growth and Development*. *Cell Rep* **17** (2016), S. 345–352.
- [102] S. C. Weber und C. P. Brangwynne. *Inverse size scaling of the nucleolus by a concentration-dependent phase transition*. *Curr Biol* **25** (2015), S. 641–646.
- [103] Y. Hara und A. Kimura. *Cell-size-dependent spindle elongation in the *Caenorhabditis elegans* early embryo*. *Curr Biol* **19** (2009), S. 1549–1554.
- [104] Y. Hara, M. Iwabuchi, K. Ohsumi und A. Kimura. *Intranuclear DNA density affects chromosome condensation in metazoans*. *Mol Biol Cell* **24** (2013), S. 2442–2453.

- [105] A.-M. Ladouceur, J. F. Dorn und P. S. Maddox. *Mitotic chromosome length scales in response to both cell and nuclear size*. J Cell Biol **209** (2015), S. 645–651.
- [106] M. Galli und D. O. Morgan. *Cell Size Determines the Strength of the Spindle Assembly Checkpoint during Embryonic Development*. Dev Cell **36** (2016), S. 344–352.
- [107] Y. Arata, H. Takagi, Y. Sako und H. Sawa. *Power law relationship between cell cycle duration and cell volume in the early embryonic development of *Caenorhabditis elegans**. Front Physiol **5** (2014), S. 529.
- [108] J. Huisken und D. Y. R. Stainier. *Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)*. Opt Lett **32** (2007), S. 2608–2610.
- [109] R. Adams und L. Bischof. *Seeded region growing*. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell **16.6** (1994), S. 641–647.
- [110] T. Lecuit und P.-F. Lenne. *Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol **8** (2007), S. 633–644.
- [111] R. M. Hochmuth. *Micropipette aspiration of living cells*. J Biomech **33** (2000), S. 15–22.
- [112] P. Kunda und B. Baum. *The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning*. Trends Cell Biol **19** (2009), S. 174–179.
- [113] O. M. Lancaster, M. Le Berre, A. Dimitracopoulos, D. Bonazzi, E. Zlotek-Zlotkiewicz, R. Picone, T. Duke, M. Piel und B. Baum. *Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation*. Dev Cell **25** (2013), S. 270–283.
- [114] M. L. Begasse, M. Leaver, F. Vazquez, S. W. Grill und A. A. Hyman. *Temperature Dependence of Cell Division Timing Accounts for a Shift in the Thermal Limits of *C. elegans* and *C. briggsae**. Cell Reports **10.5** (2015), S. 647–653.
- [115] S. Arrhenius. *Über die Dissociationswärme und den Einfluss der Temperatur auf den Dissociationsgrad der Elektrolyte*. Zeitschrift für physikalische Chemie **4.1** (1889), S. 96–116.
- [116] J. R. Pomeroy, S. Y. Kim und J. E. Ferrell. *Systems-level dissection of the cell-cycle oscillator: bypassing positive feedback produces damped oscillations*. Cell **122** (2005), S. 565–578.
- [117] B. A. Reyes, J. S. Pendergast und S. Yamazaki. *Mammalian peripheral circadian oscillators are temperature compensated*. J Biol Rhythms **23** (2008), S. 95–98.
- [118] R. Hochmuth, K. Buxbaum und E. Evans. *Temperature dependence of the viscoelastic recovery of red cell membrane*. Biophysical journal **29.1** (1980), S. 177–182.
- [119] L. G. Edgar. *Blastomere culture and analysis*. Methods Cell Biol **48** (1995), S. 303–321.
- [120] J. R. Priess. *Notch signaling in the *C. elegans* embryo*. WormBook: the online review of *C. elegans* biology (2005), S. 1–16.
- [121] M. P. Stewart, J. Helenius, Y. Toyoda, S. P. Ramanathan, D. J. Muller und A. A. Hyman. *Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding*. Nature **469** (2011), S. 226–230.

- [122] B. Sönnichsen, L. B. Koski, A. Walsh u. a. *Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans**. *Nature* **434** (2005), S. 462–469.
- [123] S. Blanchoud, C. Busso, F. Naef und P. Gönczy. *Quantitative analysis and modeling probe polarity establishment in *C. elegans* embryos*. *Biophys J* **108** (2015), S. 799–809.
- [124] R. Fickentscher und M. Weiss. *Physical determinants of asymmetric cell divisions in the early development of *Caenorhabditis elegans**. *Sci Rep* **7** (2017), S. 9369.
- [125] N. Hawkins und G. Garriga. *Asymmetric cell division: from A to Z*. *Genes & Development* **12** (1998), S. 3625–3638.
- [126] H. R. Horvitz und I. Herskowitz. *Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question*. *Cell* **68** (1992), S. 237–255.
- [127] Y. N. Jan und L. Y. Jan. *Asymmetric cell division*. *Nature* **392** (1998), S. 775–778.
- [128] P. Gönczy. *Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** (2008), S. 355–366.
- [129] J. A. Knoblich. *Asymmetric cell division during animal development*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2** (2001), S. 11–20.
- [130] S. Kotak und P. Gönczy. *Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight*. *Curr Opin Cell Biol* **25** (2013), S. 741–748.
- [131] S. Kotak, K. Afshar, C. Busso und P. Gönczy. *Aurora A kinase regulates proper spindle positioning in *C. elegans* and in human cells*. *J Cell Sci* **129** (2016), S. 3015–3025.
- [132] E. Schierenberg. *Embryological variation during nematode development*. *WormBook: the online review of *C. elegans* biology* (2006).
- [133] A. D. Werts, M. Roh-Johnson und B. Goldstein. *Dynamic localization of *C. elegans* TPR-GoLoco proteins mediates mitotic spindle orientation by extrinsic signaling*. *Development* **138** (2011), S. 4411–4422.
- [134] E. Munro und B. Bowerman. *Cellular symmetry breaking during *Caenorhabditis elegans* development*. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* **1** (2009).
- [135] C. R. Cowan und A. A. Hyman. *Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20** (2004), S. 427–453.
- [136] J. Betschinger und J. A. Knoblich. *Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates*. *Curr Biol* **14** (2004), S. 674–685.
- [137] P. Gönczy. *Mechanisms of spindle positioning: focus on flies and worms*. *Trends Cell Biol* **12** (2002), S. 332–339.
- [138] J. Pellettieri und G. Seydoux. *Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila* – PARallels and differences*. *Science* **298** (2002), S. 1946–1950.
- [139] K. S. Moorhouse und D. R. Burgess. *How to be at the right place at the right time: the importance of spindle positioning in embryos*. *Mol Reprod Dev* **81** (2014), S. 884–895.
- [140] H.-Y. Wu, E. Nazockdast, M. J. Shelley und D. J. Needleman. *Forces positioning the mitotic spindle: Theories, and now experiments*. *Bioessays* **39** (2017).

- [141] M. L. Begasse und A. A. Hyman. *The first cell cycle of the Caenorhabditis elegans embryo: spatial and temporal control of an asymmetric cell division*. Results Probl Cell Differ **53** (2011), S. 109–133.
- [142] Y. Arata, J.-Y. Lee, B. Goldstein und H. Sawa. *Extracellular control of PAR protein localization during asymmetric cell division in the C. elegans embryo*. Development **137** (2010), S. 3337–3345.
- [143] S. W. Grill, P. Gönczy, E. H. Stelzer und A. A. Hyman. *Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the Caenorhabditis elegans embryo*. Nature **409** (2001), S. 630–633.
- [144] S. W. Grill, J. Howard, E. Schäffer, E. H. K. Stelzer und A. A. Hyman. *The distribution of active force generators controls mitotic spindle position*. Science **301** (2003), S. 518–521.
- [145] J. R. Aist, H. Liang und M. W. Berns. *Astral and spindle forces in PtK2 cells during anaphase B: a laser microbeam study*. J Cell Sci **104** (1993), S. 1207–1216.
- [146] K. Colombo, S. W. Grill, R. J. Kimple, F. S. Willard, D. P. Siderovski und P. Gönczy. *Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in Caenorhabditis elegans embryos*. Science **300** (2003), S. 1957–1961.
- [147] M. Gotta und J. Ahringer. *Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in Caenorhabditis elegans embryos*. Nat Cell Biol **3** (2001), S. 297–300.
- [148] M. Gotta, Y. Dong, Y. K. Peterson, S. M. Lanier und J. Ahringer. *Asymmetrically distributed C. elegans homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo*. Curr Biol **13** (2003), S. 1029–1037.
- [149] D. G. Srinivasan, R. M. Fisk, H. Xu und S. van den Heuvel. *A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in C elegans*. Genes Dev **17** (2003), S. 1225–1239.
- [150] M.-F. B. Tsou, A. Hayashi, L. R. DeBella, G. McGrath und L. S. Rose. *LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in C. elegans embryos*. Development **129** (2002), S. 4469–4481.
- [151] L. E. Krueger, J.-C. Wu, M.-F. B. Tsou und L. S. Rose. *LET-99 inhibits lateral posterior pulling forces during asymmetric spindle elongation in C. elegans embryos*. J Cell Biol **189** (2010), S. 481–495.
- [152] H. A. Hess, J.-C. Röper, S. W. Grill und M. R. Koelle. *RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in C. elegans*. Cell **119** (2004), S. 209–218.
- [153] M. Galli, J. Muñoz, V. Portegijs, M. Boxem, S. W. Grill, A. J. R. Heck und S. van den Heuvel. *aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division*. Nat Cell Biol **13** (2011), S. 1132–1138.
- [154] C. Panbianco, D. Weinkove, E. Zanin, D. Jones, N. Divecha, M. Gotta und J. Ahringer. *A casein kinase 1 and PAR proteins regulate asymmetry of a PIP(2) synthesis enzyme for asymmetric spindle positioning*. Dev Cell **15** (2008), S. 198–208.
- [155] J.-C. Labbé, E. K. McCarthy und B. Goldstein. *The forces that position a mitotic spindle asymmetrically are tethered until after the time of spindle assembly*. J Cell Biol **167** (2004), S. 245–256.

- [156] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson und B. I. Shraiman. *Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A **109** (2012), S. 739–744.
- [157] S. J. Streichan, C. R. Hoerner, T. Schneidt, D. Holzer und L. Hufnagel. *Spatial constraints control cell proliferation in tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A **111** (2014), S. 5586–5591.
- [158] C. Kozlowski, M. Srayko und F. Nedelec. *Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos*. Cell **129** (2007), S. 499–510.
- [159] J. Pécréaux, S. Redemann, Z. Alayan, B. Mercat, S. Pastezeur, C. Garzon-Coral, A. A. Hyman und J. Howard. *The Mitotic Spindle in the One-Cell *C. elegans* Embryo Is Positioned with High Precision and Stability*. Biophys J **111** (2016), S. 1773–1784.
- [160] S. W. Grill, K. Kruse und F. Jülicher. *Theory of mitotic spindle oscillations*. Phys Rev Lett **94** (2005), S. 108104.
- [161] C. Garzon-Coral, H. A. Fantana und J. Howard. *A force-generating machinery maintains the spindle at the cell center during mitosis*. Science **352** (2016), S. 1124–1127.
- [162] A. Mogilner und E. Craig. *Towards a quantitative understanding of mitotic spindle assembly and mechanics*. J Cell Sci **123**.20 (2010), S. 3435–3445.
- [163] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot und H. Garcia. *Physical biology of the cell*. Garland Science, 2012.
- [164] A. M. Wehman, C. Poggioli, P. Schweinsberg, B. D. Grant und J. Nance. *The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos*. Curr Biol **21**.23 (2011), S. 1951–1959.
- [165] P. Jevtić und D. L. Levy. „Mechanisms of Nuclear Size Regulation in Model Systems and Cancer“. *Cancer Biology and the Nuclear Envelope: Recent Advances May Elucidate Past Paradoxes*. Hrsg. von E. C. Schirmer und J. I. de las Heras. New York, NY: Springer New York, 2014. Kap. VII-2, S. 537–569.
- [166] D. Zink, A. H. Fischer und J. A. Nickerson. *Nuclear structure in cancer cells*. Nat Rev Cancer **4** (2004), S. 677–687.
- [167] W. F. Marshall. *Subcellular size*. Cold Spring Harbor Perspect Biol **7**.6 (2015).
- [168] J. Newport und M. Kirschner. *A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage*. Cell **30** (1982), S. 675–686.
- [169] B. A. Edgar, C. P. Kiehle und G. Schubiger. *Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development*. Cell **44** (1986), S. 365–372.
- [170] W. F. Marshall. *Cellular length control systems*. Annu Rev Cell Dev Biol **20** (2004), S. 677–693.
- [171] S. Reber und N. W. Goehring. *Intracellular Scaling Mechanisms*. Cold Spring Harbor Perspect Biol **7** (2015).
- [172] N. W. Goehring und A. A. Hyman. *Organelle growth control through limiting pools of cytoplasmic components*. Curr Biol **22** (2012), S. 330–339.

- [173] M. Decker, S. Jaensch, A. Pozniakovsky, A. Zinke, K. F. O'Connell, W. Zachariae, E. Myers und A. A. Hyman. *Limiting amounts of centrosome material set centrosome size in C. elegans embryos*. *Curr Biol* **21** (2011), S. 1259–1267.
- [174] J. Hazel, K. Krutkramelis, P. Mooney, M. Tomschik, K. Gerow, J. Oakey und J. C. Gatlin. *Changes in cytoplasmic volume are sufficient to drive spindle scaling*. *Science* **342** (2013), S. 853–856.
- [175] M. C. Good, M. D. Vahey, A. Skandarajah, D. A. Fletcher und R. Heald. *Cytoplasmic volume modulates spindle size during embryogenesis*. *Science* **342** (2013), S. 856–860.
- [176] J. D. Wilbur und R. Heald. *Mitotic spindle scaling during Xenopus development by kif2a and importin β* . *eLife* **2** (2013), e00290.
- [177] G. Greenan, C. P. Brangwynne, S. Jaensch, J. Gharakhani, F. Jülicher und A. A. Hyman. *Centrosome size sets mitotic spindle length in Caenorhabditis elegans embryos*. *Curr Biol* **20** (2010), S. 353–358.
- [178] Y. Hara und A. Kimura. *An allometric relationship between mitotic spindle width, spindle length, and ploidy in Caenorhabditis elegans embryos*. *Mol Biol Cell* **24** (2013), S. 1411–1419.
- [179] F. R. Neumann und P. Nurse. *Nuclear size control in fission yeast*. *J Cell Biol* **179** (2007), S. 593–600.
- [180] P. Jorgensen, N. P. Edgington, B. L. Schneider, I. Rupes, M. Tyers und B. Futcher. *The size of the nucleus increases as yeast cells grow*. *Mol Biol Cell* **18** (2007), S. 3523–3532.
- [181] C. Bamba, Y. Bobinnec, M. Fukuda und E. Nishida. *The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo*. *Curr Biol* **12** (2002), S. 503–507.
- [182] J. Liu, T. Rolef Ben-Shahar, D. Riemer, M. Treinin, P. Spann, K. Weber, A. Fire und Y. Gruenbaum. *Essential roles for Caenorhabditis elegans lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes*. *Mol Biol Cell* **11** (2000), S. 3937–3947.
- [183] M. M. Rahman, M. Munzig, K. Kaneshiro, B. Lee, S. Strome, T. Muller-Reichert und O. Cohen-Fix. *Caenorhabditis elegans polo-like kinase PLK-1 is required for merging parental genomes into a single nucleus*. *Mol Biol Cell* **26** (2015), S. 4718–4735.
- [184] D. L. Levy und R. Heald. *Nuclear Size Is Regulated by Importin β and Ntf2 in Xenopus*. *Cell* **143** (2010), S. 288–298.
- [185] L. D. Vuković, P. Jevtić, L. J. Edens und D. L. Levy. *New Insights into Mechanisms and Functions of Nuclear Size Regulation*. *Int Rev Cell Mol Biol* (2016), S. 1–59.
- [186] A. Einstein. *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*. *Ann Phys* **322.8** (1905), S. 549–560.
- [187] M. Von Smoluchowski. *Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen*. *Ann Phys* **326.14** (1906), S. 756–780.
- [188] H. C. Berg. *Random walks in biology*. Princeton University Press, 1993.

- [189] I. Lang, M. Scholz und R. Peters. *Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells*. J Cell Biol **102** (1986), S. 1183–1190.
- [190] M. Kumar, M. S. Mommer und V. Sourjik. *Mobility of cytoplasmic, membrane, and DNA-binding proteins in Escherichia coli*. Biophys J **98** (2010), S. 552–559.
- [191] A. M. Mastro, M. A. Babich, W. D. Taylor und A. D. Keith. *Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A **81** (1984), S. 3414–3418.
- [192] I. Bronshtein, E. Kepten, I. Kanter u. a. *Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior*. Nat Commun **6** (2015), S. 8044.
- [193] M. Oeffinger und D. Zenklusen. *To the pore and through the pore: a story of mRNA export kinetics*. Biochim Biophys Acta **1819** (2012), S. 494–506.
- [194] D. J. Anderson und M. W. Hetzer. *Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation*. J Cell Biol **182.5** (2008), S. 911–924.
- [195] R. Fickentscher, P. Struntz und M. Weiss. *Setting the Clock for Fail-Safe Early Embryogenesis*. Phys Rev Lett **117** (2016), S. 188101.
- [196] S. van den Heuvel. *Cell-cycle regulation*. WormBook: the online review of C. elegans biology (2005).
- [197] M. Boxem. *Cyclin-dependent kinases in C. elegans*. Cell division **1.1** (2006), S. 6.
- [198] J. Liu und E. T. Kipreos. *Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa*. Mol Biol Evol **17.7** (2000), S. 1061–1074.
- [199] Q. Yang und J. E. Ferrell Jr. *The Cdk1–APC/C cell cycle oscillator circuit functions as a time-delayed, ultrasensitive switch*. Nat Cell Biol **15.5** (2013), S. 519–525.
- [200] S. Mochida, S. Rata, H. Hino, T. Nagai und B. Novák. *Two bistable switches govern M phase entry*. Curr Biol **26.24** (2016), S. 3361–3367.
- [201] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, R. Jackson u. a. *Campbell biology*. Pearson Boston, 2014.
- [202] M. Jackman, C. Lindon, E. A. Nigg und J. Pines. *Active cyclin B1–Cdk1 first appears on centrosomes in prophase*. Nat Cell Biol **5.2** (2003), S. 143–148.
- [203] L. Jones, H. Richardson und R. Saint. *Tissue-specific regulation of cyclin E transcription during Drosophila melanogaster embryogenesis*. Development **127** (2000), S. 4619–4630.
- [204] D. A. Lehman, B. Patterson, L. A. Johnston, T. Balzer, J. S. Britton, R. Saint und B. A. Edgar. *Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string/Cdc25*. Development **126** (1999), S. 1793–1803.
- [205] M. Shtutman, J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D’Amico, R. Pestell und A. Ben-Ze’ev. *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A **96** (1999), S. 5522–5527.
- [206] J. Pines. *Four-dimensional control of the cell cycle*. Nat Cell Biol **1.3** (1999), E73–E79.
- [207] L. A. Porter, D. J. Donoghue u. a. *Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators*. Prog Cell Cycle Res **5** (2003), S. 335–348.

- [208] K. E. Gascoigne und I. M. Cheeseman. *CDK-dependent phosphorylation and nuclear exclusion coordinately control kinetochore assembly state*. J Cell Biol **201.1** (2013), S. 23–32.
- [209] C. Zhang, P. R. Clarke, Q. Chen, Q. Jiang und X. Zhang. *Cyclin B1 is localized to unattached kinetochores and contributes to efficient microtubule attachment and proper chromosome alignment during mitosis*. Cell Res **18.2** (2008), S. 268.
- [210] L. A. Lee und T. L. Orr-Weaver. *Regulation of cell cycles in Drosophila development: intrinsic and extrinsic cues*. Annu Rev Genet **37.1** (2003), S. 545–578.
- [211] E. Zamir, Z. Kam und A. Yarden. *Transcription-dependent induction of G1 phase during the zebra fish midblastula transition*. Mol Cell Biol **17.2** (1997), S. 529–536.
- [212] N. Tikhmyanova und T. R. Coleman. *Isoform switching of Cdc6 contributes to developmental cell cycle remodeling*. Developmental biology **260.2** (2003), S. 362–375.
- [213] M. Brauchle, K. Baumer und P. Gönczy. *Differential activation of the DNA replication checkpoint contributes to asynchrony of cell division in C. elegans embryos*. Curr Biol **13** (2003), S. 819–827.
- [214] Z. Bao, Z. Zhao, T. J. Boyle, J. I. Murray und R. H. Waterston. *Control of cell cycle timing during C. elegans embryogenesis*. Dev Biol **318** (2008), S. 65–72.
- [215] B. W. Draper, C. C. Mello, B. Bowerman, J. Hardin und J. R. Priess. *MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early C. elegans embryos*. Cell **87** (1996), S. 205–216.
- [216] T. Kaletta, H. Schnabel und R. Schnabel. *Binary specification of the embryonic lineage in Caenorhabditis elegans*. Nature **390** (1997), S. 294–298.
- [217] M. F. Maduro, R. J. Hill, P. J. Heid, E. D. Newman-Smith, J. Zhu, J. R. Priess und J. H. Rothman. *Genetic redundancy in endoderm specification within the genus Caenorhabditis*. Dev Biol **284** (2005), S. 509–522.
- [218] Y. Budirahardja und P. Gonczy. *PLK-1 asymmetry contributes to asynchronous cell division of C. elegans embryos*. Development **135** (2008), S. 1303–1313.
- [219] D. M. Rivers, S. Moreno, M. Abraham und J. Ahringer. *PAR proteins direct asymmetry of the cell cycle regulators Polo-like kinase and Cdc25*. J Cell Biol **180.5** (2008), S. 877–885.
- [220] Y. Nishi, E. Rogers, S. M. Robertson und R. Lin. *Polo kinases regulate C. elegans embryonic polarity via binding to DYRK2-primed MEX-5 and MEX-6*. Development **135** (2008), S. 687–697.
- [221] E. Schierenberg, J. Miwa und G. von Ehrenstein. *Cell lineages and developmental defects of temperature-sensitive embryonic arrest mutants in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol **76** (1980), S. 141–159.
- [222] E. Schierenberg. *Altered cell-division rates after laser-induced cell fusion in nematode embryos*. Dev Biol **101** (1984), S. 240–245.
- [223] H. Turlier, B. Audoly, J. Prost und J.-F. Joanny. *Furrow Constriction in Animal Cell Cytokinesis*. Biophys J **106** (2014), S. 114–123.
- [224] J. T. Wang und G. Seydoux. *P granules*. Curr Biol **24** (2014), S. 637–638.

- [225] E. Voronina und G. Seydoux. *The C. elegans homolog of nucleoporin Nup98 is required for the integrity and function of germline P granules*. *Development* **137** (2010), S. 1441–1450.
- [226] D. L. Updike, S. J. Hachey, J. Kreher und S. Strome. *P granules extend the nuclear pore complex environment in the C. elegans germ line*. *J Cell Biol* **192** (2011), S. 939–948.
- [227] S. Krauß. *Quantifizierung der Korrelation von Teilungszeiten und Zellvolumina während der Embryogenese von Caenorhabditis elegans*. Bachelorarbeit. Universität Bayreuth, Lehrstuhl Experimentalphysik 1, 2017.
- [228] D. Joseph-Strauss, M. Gorjánácz, R. Santarella-Mellwig, E. Voronina, A. Audhya und O. Cohen-Fix. *Sm protein down-regulation leads to defects in nuclear pore complex disassembly and distribution in C. elegans embryos*. *Dev Biol* **365** (2012), S. 445–457.
- [229] C. M. Gallo, J. T. Wang, F. Motegi und G. Seydoux. *Cytoplasmic partitioning of P granule components is not required to specify the germline in C. elegans*. *Science* **330.6011** (2010), S. 1685–1689.
- [230] J. T. Wang, J. Smith, B.-C. Chen, H. Schmidt, D. Rasoloson, A. Paix, B. G. Lambrus, D. Calidas, E. Betzig und G. Seydoux. *Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically-disordered proteins in C. elegans*. *eLife* **3** (2014), e04591.
- [231] O. Hertwig. *Das Problem der Befruchtung und der Isotropie des Eies, eine Theorie der Vererbung*. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* **18** (1885), S. 175–205.
- [232] J. Rudnick und G. Gaspari. *The asphery of random walks*. *J Phys A: Math Gen* **19.4** (1986), S. 191.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern beziehungsweise -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.

Rolf Fickentscher