

Aus dem Institut für Anatomie und Embryologie

(Prof. Dr. med. C. Viebahn)

im Zentrum Anatomie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Über den neurenterischen Kanal im  
Embryo des Menschen und des  
Neuweltaffen *Callithrix jacchus***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Alexander Rulle

aus

Münster

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in Prof. Dr. med. C. Viebahn

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. R. Behr

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. med. C. Viebahn

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. R. Behr

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 09.07.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Über den neurenterischen Kanal im Embryo des Menschen und des Neuweltaffen *Callithrix jacchus*“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Gegenstand und Bedeutung der Embryologie .....	1
1.2 Der neurenterische Kanal .....	1
1.3 Klinische Relevanz des neurenterischen Kanals .....	4
1.4 Aufgabenstellung.....	5
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1 Die verwendeten Präparate.....	7
2.1.1 Die menschlichen Embryonen.....	7
2.1.2 Die Weißbüschelaffenembryonen .....	9
2.2 <i>Whole-mount in situ hybridization</i> (WISH).....	10
2.3 Arbeitsablauf der dreidimensionalen Rekonstruktion (3DR).....	10
2.4 Dreidimensionale Rekonstruktion von mikroskopischen Strukturen.....	12
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>16</b>
3.1 Morphologische Beschreibung der Präparate.....	16
3.1.1 Morphologie der menschlichen Embryonen .....	16
3.1.2 Morphologie der <i>Callithrix</i> -Embryonen.....	21
3.2 Asymmetrische <i>Nodal</i> -Expression im <i>Callithrix</i> -Embryo GM79.01 .....	22
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>24</b>
4.1 Überlegungen zum Nutzen der dreidimensionalen Rekonstruktion (3DR) .....	24
4.2 Die Existenz des neurenterischen Kanals und des Chordakanals.....	26
4.3 Die Homologie des neurenterischen Kanals zum Blastoporus .....	28
4.4 Die frühe Etablierung der Links-/Rechtsasymmetrie beim Menschen und anderen Primaten.....	29
4.5 Ausblick und Perspektiven .....	30
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>32</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>33</b>
6.1 Internetquellen .....	38
<b>7 Anhang .....</b>	<b>39</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3DR	dreidimensionale Rekonstruktion
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HINC	<i>hinge of involuting notochord cells</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
SCM	subchordales Mesoderm
SOI	<i>structure of interest</i>
SUB	Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek
WISH	<i>whole-mount in situ hybridization</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Gegenstand und Bedeutung der Embryologie

Embryologie ist die Lehre der Entstehung des Lebens von der befruchteten Eizelle bis zur Geburt. Sie beschreibt die Entwicklungsmorphologie der verschiedenen Gewebe und Organe eines Organismus und fragt nach den Mechanismen der Differenzierung und Dedifferenzierung von Zellen. Ihre Erkenntnisse legen so Grundlagen für das Verständnis der intrauterinen Anatomie und Entwicklung des Embryos. Dies geschieht oftmals anhand von Beobachtungen an histologischen Präparaten. Die humane Embryologie zeichnet hierbei eine wesentliche Besonderheit aus: Vor allem für die frühen Entwicklungsstufen des Menschen sind nur wenige Exemplare bekannt. So treten beispielsweise die für die vorliegende Arbeit relevanten Stadien 8 (Embryonen vor der Somitenbildung gemäß O’Rahilly und Müller (1987)) und 9 (Embryonen mit maximal drei Somitenpaaren) nur für eine Dauer von 48 bis 72 Stunden auf (das heißt zwischen dem neunzehnten und einundzwanzigsten Entwicklungstag) und sind nur 1 bis 2,5 mm groß (O’Rahilly und Müller 1987). Die Mütter wissen zu diesem Zeitpunkt meist noch nicht von ihrer Schwangerschaft. Daher sind selbst Zufallsbefunde – zum Beispiel im Rahmen einer medizinisch indizierten Hysterektomie – selten. So weist die Kyoto Collection, eine der größten embryologischen Sammlungen der Welt, von 22.262 untersuchten menschlichen Exemplaren nur vier Präparate des Stadiums 8 und drei des Stadiums 9 auf (Kameda et al. 2012). Bereits beschriebene menschliche Embryonen sind in verschiedenen Sammlungen wie der Carnegie Collection in Washington D.C., der Blechschmidt-Sammlung in Göttingen, oder eben der Kyoto Collection in Kyoto und damit über die ganze Welt verstreut. Sie sind somit nur mit großem Aufwand zugänglich. Folglich ist ein systematischer Vergleich der vorhandenen Exemplare erschwert. Es ist daher oft schwierig, eine physiologische Entwicklung von Normvarianten, Pathologien und durch die Präparation erworbenen Artefakten abzugrenzen.

## 1.2 Der neurenterische Kanal

Paradigmatisch für die Herausforderungen bei der Arbeit mit frühen menschlichen Embryonen steht eine mikroskopische Struktur, die Ende des neunzehnten Jahrhunderts zum ersten Mal beschrieben wurde und den Namen „neurenterischer Kanal“ (oder lateinisch *Canalis neurentericus*) erhielt. Seine Bedeutung für die Embryologie und die menschliche Entwicklung steht in engem Zusammenhang mit der Entstehung der drei Keimblätter

Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Diese erst ermöglichten die Komplexität von höheren Organismen wie Tieren, inklusive des Menschen. Die dafür entscheidende Entwicklungsphase wird auf Grund seiner morphologischen Ähnlichkeit zu einem kleinen Magen (griech. γαστήρ *gaster*) im Augenblick der Erstbeschreibung Gastrulation genannt (Haeckel 1874). In Amphibien und Reptilien findet dieser Prozess durch eine zelluläre Involutionsbewegung, also ein „Einwärtsdrehen“, der äußeren Keimscheibenschicht (des Epiblasten) an den dorsalen Lippen einer kanalartigen Struktur, dem Blastoporus, statt. Säugetiere und die meisten Vögel dagegen entwickeln die drei Keimblätter a) durch eine intraepitheliale Migrationsbewegung von Zellen entlang der kraniokaudalen Achse, und b) durch Ingression und epithelio-mesenchymale Transition, dem Einwandern und Polaritätsverlust von epiblastären Zellen entlang einer länglichen Struktur, dem Primitivstreifen. Das kraniale Ende des Primitivstreifens bildet dabei der Primitivknoten (oder Hensen-Knoten). Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit sind Blastoporus und Primitivstreifen wiederholt als homolog, sich von einem gemeinsamen Vorfahren ableitend, bezeichnet worden (Arendt und Nübler-Jung 1999).

Interessanterweise wurde auch in menschlichen Embryonen schon früh (von Spee 1889) ein senkrechter Kanal im Primitivknoten beschrieben. Zuvor war eine ähnliche Struktur in Dornhaiembryonen (*Squalus acanthias*) und der Zweifarbfledermaus (*Vespertilio murinus*), einem Säugetier, beobachtet worden (Kowalevsky 1877; von Beneden 1888; Neuhauser und Kaufmann 1961). Dieser Kanal wurde neurenterischer Kanal genannt, da er die noch im Entstehen begriffenen Bereiche von Nerven- und Darmsystem miteinander verband. Es ist unklar, auf welchen Autor genau diese Namensgebung zurückgeht, spätestens jedoch am Ende des neunzehnten Jahrhunderts scheint er regelhaft in Gebrauch gewesen zu sein (Neuhauser und Kaufmann 1961). Der Begriff und das Konzept einer senkrechten Verbindung zwischen dorsaler und ventraler Oberfläche des Embryos wurden oft und wiederkehrend in Fallstudien zu den unterschiedlichsten Spezies wie Maus, Lanzettfisch und Primaten wie Makake und Pavian aufgegriffen und diskutiert (Selenka 1900; Heuser und Streeter 1941; Hendrickx 1971; Samassa 1898; Sobotta 1911). Zu den Primaten zählt auch der Neuweltaffe *Callithrix jacchus*. Dieser ist in der Virologie (Greenough et al. 2005; Leibovitch et al. 2013) und Stammzellforschung (Sasaki et al. 2005; Boroviak et al. 2015; Debowski et al. 2016) bereits als Modell etabliert worden.

Wegen einer äußerlichen Ähnlichkeit zu dem bereits bekannten Blastoporus wurde von einigen Autoren eine Homologie von Blastoporus und neurenterischem Kanal angenommen (Hoffmann 1883). Dennoch blieb eine genaue und von der Fachwelt akzeptierte Definition

bis heute aus. Ein entwicklungsbiologischer Zusammenhang mit dem eher longitudinal verlaufenden Chordakanal blieb spekulativ (O’Rahilly und Müller 1987). Eine Kontroverse entspann sich ebenfalls über die Frage, ob das Auftreten eines neurenterischen Kanals zu einer normgerechten Entwicklung zählt (Odgers 1941; O’Rahilly und Müller 1981), oder ein postmortal erworbenes Artefakt darstellt (Sternberg 1927). Die Lage war derart verwirrend, dass sogar der Erstbeschreiber, der Embryologe A.O. Kowalevsky, mit seinen Zeitgenossen, dem Arzt P.I. Kovalevski und dem Physiologen N.O. Kowalevsky verwechselt wurde (Neuhauser und Kaufmann 1961). Hierzu trug sicherlich bei, dass der Name A.O. Kowalevskys teilweise auch unterschiedlich transkribiert wurde (deutsche Schreibweise "Kowalevsky" (Kowalevsky 1871), englische Schreibweise "Kovalevski" (Neuhauser und Kaufmann 1961)).

Selbst als klinisch tätige Ärzte über die mögliche Rolle eines persistierenden neurenterischen Kanals in der Pathogenese von seltenen fetalen Malformationen spekulierten, blieben die Lehrmeinungen zu seiner Existenz uneinheitlich (Holschneider und Fendel 1971; Springer 1972; Holschneider und Fendel 1972). Einigen Autoren grenzten den etwas früher entstehenden Chordakanal vom neurenterischen Kanal ab (Grosser 1924). Der Chordakanal wiederum verläuft in longitudinaler Richtung durch die Keimscheibe. Er liegt damit a) zwischen der aus epithelial differenzierten Zellen bestehenden, noch plattenartigen Chorda dorsalis dorsal und b) mesenchymalen Zellen des axialen Mesoderms ventral (Eternod 1899; Heuser 1932). Die Chorda dorsalis wiederum spielt in der späteren Entwicklung eine wichtige Rolle in der Entstehung des Neuralrohrs und damit der Entwicklung von Gehirn und Rückenmark (Purves et al. 2001). Die ventralen mesenchymalen Zellen des axialen Mesoderms wurden auch in Hühnerembryonen beobachtet (Tsikolia et al. 2012) und dort subchordales Mesoderm (SCM) genannt. Ein neurenterischer Kanal oder Chordakanal ist bisher in Hühnerembryonen nicht nachgewiesen. Die Existenz des SCM hat sich dagegen auch in Säugetieren wie Schwein und Rind bestätigt (Schröder et al. 2016). Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus scheint sich das SCM später aufzulösen und so der Chordaplatte eine direkte Verbindung zum Dottersackinhalt zu gewähren. Das kaudale Ende des Chordakanals, das durch eine dorsale Öffnung schon Kontakt zur Amnionhöhle hatte, erhält somit eine beinahe senkrecht durch den Primitivknoten verlaufende Verbindung zum Dottersack. Ab diesem Moment passt diese Verbindung in die Definition eines neurenterischen Kanals (O’Rahilly und Müller 1987). Dieser Kanal verbindet Amnionhöhle und Dottersack miteinander und durchtritt damit alle drei Keimscheibenschichten.



Von Bedeutung ist hierbei die Definition eines „*charnière de réflexion*“ (Pasteels 1943), das später, nach Beobachtungen an Krallenfrosch und Maus „*chordoneural hinge*“ benannt wurde (Gont et al. 1993; Beck und Slack 1998; Cambray und Wilson 2002). Dieser *chordoneural hinge* bezeichnet eine Kontaktzone von Neuroektoderm und Chordaplatte, die kranial des neurenterischen Kanals liegt. Hieraus wandern in der späteren Entwicklung Stammzellen aus. Beide Schichten, das Neuroektoderm und die Chordaplatte, gehen an der Stelle des *chordoneural hinge* durch eine 180°-Kehre des Epithels ineinander über. Dieser Vorgang wurde im Deutschen „Umbördeln“ (Sander 2001) und im Englischen „Involution“ (Gilbert 2003) genannt.

Die Region des Primitivknotens (und des axialen Mesoderms) hat räumlich und zeitlich eine enge Verbindung zur erstmaligen Etablierung der Links-/Rechtsasymmetrie des Embryos, angezeigt durch eine molekulare Asymmetrie des Gens *Nodal* (Blum et al. 2007). Diese Achse, auch als dritte Körperachse bezeichnet, wird unabhängig von den anderen Achsen festgelegt. Ihre Ausrichtung ist Voraussetzung für eine korrekte Anlage der asymmetrisch verteilten Bauchorgane. Für Fische, Krallenfrösche, Kaninchen und Mäuse konnte dabei wiederholt die Bedeutung von motilen und immotilen Zilien im Bereich des ventralen Primitivknoten nachgewiesen werden. Diese induzieren einen linksgerichteten extrazellulären Flüssigkeitsfluss (Yoshida und Hamada 2014; Shinohara und Hamada 2017) und folglich eine späte asymmetrische *Nodal*-Expression (Schröder et al. 2016). Für einen Einfluss von Zilien sprechen bei anderen Säugetieren und Menschen Beobachtungen beim Karthagener Syndrom. Dieses Krankheitsbild geht mit Ziliendefekten und einer fünfzigprozentigen Wahrscheinlich von spiegelbildlich verteilten Bauchorganen einher (Blum et al. 2014). Dennoch zeigen Daten vom Huhn, Schwein und Rind (Männer 2001; Tsikolia et al. 2012; Schröder et al. 2016) eine wahrscheinlich primär von Zilien unabhängige molekulare Brechung der Links-/Rechtsachsensymmetrie. Bei diesen Spezies geht dabei die frühe asymmetrische *Nodal*-Expression im paraxialen Mesoderm mit einer verzögerten Rückbildung des SCM einher (Schröder et al. 2016).

### 1.3 **Klinische Relevanz des neurenterischen Kanals**

In vielfältiger Weise ist das Wissen über die Embryologie im klinischen Alltag und praktischen Anwendungen angelangt. Durch immer genauere Pränatalsonographie sind auch frühe Entwicklungsschritte zunehmend sichtbar (Khurana et al. 2017; Katorza et al. 2018). In Fächern wie der Viszeralchirurgie ergeben sich aus dem Wissen über den Aufbau der

Schichten des Kolorektums für die fasziengerechte Mesorektalchirurgie (Sharma und Monson 2018) sogar unmittelbare therapeutische Konsequenzen in der Behandlung von Patienten.

Für den neurenterischen Kanal wird ein Einfluss bei der Entstehung von *junctional neurulation defects* diskutiert. Bei dieser Pathologie kann der Bereich der primären Neurulation nicht mit dem Bereich der sekundären Neurulation fusionieren. Folglich bleibt der kraniale Teil des Nervengewebes, bestehend aus einem kontinuierlich in der Längsachse induzierten Neuroektoderm, von dem kaudalen Teil des Nervengewebes, entstanden durch ausgewachsene Nervenvorläuferzellen, getrennt. Auf diesem Wege entstehen zwei unverbundene Rückenmarkskoni im Spinalkanal (Dady et al. 2014; Eibach et al. 2017; Schmidt et al. 2017; Florea et al. 2018). Gleiches gilt für seltene, schwere Malformationen, die als *split notochord syndrome* zusammengefasst werden. Diese gehen mit dorsalen intestinalen Fisteln, geteilten Lumbal- oder Sakralwirbelkörpern und intestinalen Fehlbildungen einher (Bentley und Smith 1960; Singh und Singh 1982; Gupta und Deodhar 1987; Dhawan et al. 2017). Immer wieder kommt die Idee eines persistierenden neurenterischen Kanals als Krankheitsursache zur Diskussion (Holschneider und Fendel 1971). Auch als Migrationsroute für endodermale Stammzellen wird ein neurenterischer Kanal diskutiert (Santos de Oliveira et al. 2005; Mittal et al. 2010; Yang et al. 2015). Diese fehlplatzierten Endodermzellen können sich im gesamten Neuralkanal ansiedeln und bedürfen dann als neuroendodermale Zysten einer chirurgischen Intervention.

Eine Klärung der Existenz des neurenterischen Kanals und seiner möglichen funktionellen Ähnlichkeit zum Blastoporus hat somit erstens Relevanz für die Frage nach der Enge von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Arten in der Grundlagenforschung. Zweitens aber auch direkte Berührungspunkte zu klinischen Fächern wie der Pädiatrie und der Neurochirurgie, die die Pathogenese von embryonalen Fehlbildungen diskutieren. Allerdings ist ein Verständnis von morphologischen und funktionellen Zusammenhängen durch den Verlust des räumlichen Aufbaus des nativen Embryos nach histologischer Aufarbeitung erschwert. Analoge Rekonstruktionsmethoden sind daher beinahe so alt wie die Histologie selbst (Born G 1883; Gühr 1961). Sie erschaffen aus Schnitten wieder zeichnerische oder modellhafte dreidimensionale Objekte, um embryologische Erkenntnisse einem breiten Publikum zugänglich zu machen.

## 1.4 Aufgabenstellung

Die erste Beobachtung eines neurenterischen Kanals ist beinahe einhundertfünfzig Jahre her. Der Begriff und Konzept eines senkrechten Kanals in der Mitte des Primitivknotens

wurden oft und teils widersprüchlich benutzt. Eine genaue und von der Fachwelt akzeptierte Definition steht bis heute aus. Der entwicklungsbiologische Zusammenhang mit Chordakanal blieb spekulativ (O’Rahilly und Müller 1987). Ebenso kamen Meinungen auf, der neurenterische Kanal stelle ohnehin nur ein Präparationsartefakt dar (Sternberg 1927). Und das, obwohl klinisch tätige Ärzte bereits über eine mögliche pathophysiologische Bedeutung des neurenterischen Kanals spekulierten (siehe 1.3). Selbst der Erstbeschreiber des neurenterischen Kanals wurde teils mit seinen Zeitgenossen verwechselt (Neuhauser und Kaufmann 1961).

Aus all diesen Gründen versucht die vorliegende Dissertation erstmals eine systematische und zeitlich kleinschrittige Untersuchungsserie an Embryonen des Menschen und des Neuweltaffen *Callithrix jacchus*. Dabei bilden neue Beobachtungen an einem exzellent erhaltenen Embryo des Stadiums 8a der Sammlung der Anatomie und Embryologie Göttingen die Grundlage. Hinzu kommen zwei neu zugängliche Weißbüschelaffenembryonen (*Callithrix jacchus*) ähnlicher Stadierung. Im Gegensatz zu menschlichen Präparaten können diese zeitlich abgestimmt und damit zielgerichtet im benötigten Stadium entnommen werden. So sind optimale Präparationsbedingungen und eine Untersuchung an bisher fehlenden Entwicklungsschritten gewährleistet. Mit den hieraus abgeleiteten Erkenntnissen soll die Histologie von vier schon veröffentlichten, allerdings weniger gut erhaltenen menschlichen Embryonen neu interpretiert werden. In dieser Zusammenschau wird die Frage nach der Existenz des neurenterischen Kanals, seiner Begrenzungen und seiner engen topografischen und zeitlichen Beziehung zu der entstehenden Chorda dorsalis neu betrachtet.

Darüber hinaus soll mit der digitalen Rekonstruktion und dem anschließenden dreidimensionalen Druck nach Methoden gesucht werden, die Ergebnisse auch einem nicht embryologisch vorgebildeten Publikum verständlich zu machen. Erstmals werden hierbei die methodischen Herausforderungen und Fehlerquellen, die sich bei der Rekonstruktion von mikroskopisch kleinen Strukturen ergeben, systematisch betrachtet und herausgearbeitet. Unter Zuhilfenahme von bereits publizierten Arbeiten über einige Primaten kann weitergehend ein Rückschluss auf die phylogenetische Entwicklung des lebensformenden Prozesses der Gastrulation gewagt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die verwendeten Präparate

Alle in dieser Studie präsentierten Präparate sind in Tabelle 1 genannt und gemäß ihrer Stadierung gelistet. Die Verwendung der Gesamtansichten bzw. früheren Rekonstruktionen der Embryonen ist durch die jeweiligen Verlage genehmigt worden (siehe separate Hinweise auf den Ort der Veröffentlichung).

Tabelle 1 Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten Embryonen

Spezies	Name	Jahr der Publi- kation	Ort der Aufbewahrung	Stadium	Schnitt- richtung	Anzahl der verwendeten Schnitte. + in der engen 3DR; * in der weiten 3DR
Mensch	93.2.2	2001	Göttingen	8a	sagittal	24 <sup>+</sup> /4*
Mensch	CC8671	1949	Washington	8a	sagittal	30 <sup>+</sup> /6*
Mensch	Dobbin	1931	Berlin	8b	transversal	55 <sup>+</sup>
Mensch	CC10157	1967	Washington	8b	schräg transversal	39 <sup>+</sup> /16*
Mensch	Da1	1928	unbekannt	9	transversal	6 <sup>+</sup>
<i>Callithrix</i>	GM79.01	2018	Göttingen	8b	transversal	65 <sup>+</sup>
<i>Callithrix</i>	GP09.01	2018	Göttingen	9	transversal	34 <sup>+</sup>

#### 2.1.1 Die menschlichen Embryonen

Der menschliche Embryo 93.2.2 wurde im Zuge der Dissertationsschrift von Frau Iris Sander (Sander 2001) zum ersten Mal wissenschaftlich erfasst und analog rekonstruiert. Er erfuhr mit Rulle et al. (2018) seine internationale Veröffentlichung. Wahrscheinlich stammte er aus einer wissenschaftlichen Kooperation des Zentrums Anatomie Göttingen unter Professor

Gerd Steding mit der chinesischen medizinischen Universität Guangxi in Nanning, China. Die in den Sammlungen der Anatomie Göttingen hierzu hinterlassenen Aufzeichnungen waren jedoch lückenhaft, benannten keine konkreten Präparate und ließen somit keine genaue Klärung der Provenienz zu (Prof. Christoph Viebahn, mündliche Mitteilung am 20.05.2019). Forschung an dem Embryo ist durch einen Entscheid der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen unter der Nummer 28/2/18An zugelassen worden. Bekannt ist, dass der Embryo 1993 bei einer medizinisch indizierten Abrasio uteri als Zufallsbefund entdeckt wurde. Er wurde sagittal mit einer Schnittdicke von 10  $\mu\text{m}$  geschnitten und mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) gefärbt. Gemäß der unter Embryologen etablierten Stadierungstabelle für menschliche Embryonen von (O’Rahilly und Müller 1987) und einer in dieser Arbeit für bessere Vergleichbarkeit weitergehend vorgenommenen Unterscheidung in 8a (Chordaplatte ist ventral noch von SCM bedeckt) und 8b (Chordaplatte liegt ventral frei und hat damit direkten Kontakt zum Dottersackinhalt), konnte das Präparat 93.2.2 in das Stadium 8a eingeordnet werden.

Die menschlichen Embryonen CC8671 (Stadium 8a, sagittal 6  $\mu\text{m}$  dick geschnitten, H&E gefärbt, Erstveröffentlichung in Hertig und Gore (1966), Erstbeschreibung in Hertig (1968), grob rekonstruiert von de Bakker et al. (2016)) und CC10157 (Stadium 8b, schräg transversal 5-8  $\mu\text{m}$  dick geschnitten, Cason gefärbt (O’Rahilly und Müller 1987)) gehören zu der Carnegie Collection in Washington D.C. Die Bilder der Schnitte waren im Internet zur freien Verwendung verfügbar (3datlas.3dembryo.nl; virtualhumanembryo.lsuhsu.edu, DREM\_disks). Die Beschriftung der Schnitte von CC10157 zeigte sich leider gegenläufig zu der Beschriftung der Objektträger, auf denen die Schnitte liegen. Hierdurch ergaben sich Schwierigkeiten in der wirklichkeitsgetreuen Rekonstruktion des Embryos (siehe Diskussion). Die in dieser Arbeit gezeigten Rekonstruktionen folgen jedoch der Links-/Rechtsorientierung der auf der Internetseite (virtualhumanembryo.lsuhsu.edu, Disp\_FS) gezeigten Rekonstruktion. Das Präparat „Dobbin“ (Stadium 8a, transversal 8  $\mu\text{m}$  dick geschnitten, unbekannte Färbung, Erstbeschreibung durch Hill und Florian (1931)) ist in der Sammlung des Naturkundemuseums Berlin gelistet und wurde dort durch den Autor dieser Arbeit fotografiert. Der Aufbewahrungsort des Embryos „Da1“ (Stadium 9, transversal 8  $\mu\text{m}$  dick geschnitten, mit Alaun-Cochenille gefärbt, Erstbeschreibung durch Ludwig (1928) ist gegenwärtig unbekannt, die Fotografien wurden der Originalpublikation entnommen.

### 2.1.2 Die Weißbüschelaffenembryonen

Alle für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden gemäß des Deutschen Tierschutzgesetzes, wie durch Aeckerle et al. (2015) beschrieben, behandelt. Sie erfuhren mit der Arbeit von Rulle et al. (2018) ihre Erstveröffentlichung. Die Gewinnung der beiden *Callithrix jacchus*-Embryonen war durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Nahrungsmittelsicherheit unter der Nummer 42502-04-12/0708 genehmigt worden. Die Tiere stammten aus der Kolonie des Deutschen Primatenzentrums in Göttingen und waren primär für die Stammzellforschung vorgesehen. Bei Durchführung der Hysterektomie durch eine erfahrene Veterinärmedizinerin war das erste Muttertier mit der Nummer #14457 sechs Jahre und fünf Monate, das zweite mit der Nummer #12944 sieben Jahre und zehn Monate alt. Hierzu wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Applikation von Diazepam und „Göttinger Mischung II“ (bestehend aus Ketamin, Xylazin und Atropin) sediert und mit einer Überdosis Pentobarbital intrakardial getötet. Die entnommenen Uteri wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) präpariert, die herausgelösten Embryonen nach Fotografie durch 4% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Die Stadierung wurde gemäß O’Rahilly und Müller (1987) vorgenommen. Die nicht für die Stammzellstudien benötigten Abschnitte der Embryonen folgten verschiedenen Prozessierungsschritten. Der Embryo GM79.01 (Stadium 8b) wurde nach Entwässerung in -20°C kaltem Ethanol zwischengelagert, um später dem unten genannten *whole-mount in situ hybridization* (WISH)-Protokoll für *Nodal* zu folgen. Hiernach folgte die Einbettung in Technovit® 8100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland), dann das Schneiden für die Histologie und das Fotografieren mittels *differential interference contrast*. Ein paar Schnitte konnten für Testfärbungen nicht mit der originalen *Nodal*-Expression erfasst werden. Durch diese Tests sollte die Färbung mit der für die 3DR notwendigen, optimalen Sichtbarkeit der Zellgrenzen ermittelt werden. Nachdem der überwiegende Teil der *Nodal*-Domäne so digital archiviert werden konnte, wurden auch diese Schnitte gemäß dem H&E-Protokoll nach Gill zwanzig Minuten lang gefärbt und die *Nodal*-Expression so überfärbt. Der Embryo GP09.01 (Stadium 9) wurde in Bouinlösung (30% Pikrinsäure, 30% Essigsäure, 4% Formaldehyd in PBS) fixiert, in Paraffinwachs eingebettet und nach der histologischen Aufarbeitung gemäß Gill (Bancroft et al. 2013) für anderthalb Minuten mit Hämatoxylin und für fünf Minuten mit Eosin gefärbt.

## 2.2 *Whole-mount in situ hybridization (WISH)*

Ziel der WISH ist es, durch spezifische mRNA-Produkte und damit die produzierten Proteine einen Einblick in den molekularen Haushalt von Zellen eines zusammenhängenden Präparates zu erhalten. Die hierfür notwendige, zu der gesuchten mRNA komplementäre RNA (cRNA), wurde hierzu durch In-vitro-Transkription von einer durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vermehrten cDNA-Vorlage gewonnen. Die weitere Prozessierung erfolgte wie von Püschel und Jouneau (2015) beschrieben und ist im Folgenden nur kurz dargestellt. Der bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Ethanol gelagerte Embryo wurde rehydriert und 15 Minuten lang mit Proteinase K behandelt, um ein besseres Eindringen der cRNA in subzelluläre Strukturen zu erreichen, dann mit 0,2% Glutaraldehyd/PBS mit Tween, einem Emulgator, refixiert und anschließend eine Stunde bei  $70^{\circ}\text{C}$  in Hybridisationspuffer (Formamide, Salzlösung Natriumcitratpuffer (pH 4,5), 0,5 mM EDTA, 10 mg/ml t-RNA, 0,2% Tween 20, 10% CHAPS, and 50 mg/ml Heparin) prähybridisiert, um unspezifische Bindungsreaktionen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Hybridisierung, also die Anlagerung der komplementären Stränge, mit  $1\ \mu\text{l}$  digoxigeninmarkierter RNA bei  $70^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Überschüssige RNA wurde mit Hybridisationspuffer und Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 (pH 7,5)) abgewaschen, bevor eine unspezifische Antikörperfärbereaktion im nächsten Schritt durch Zugabe von Maleinsäurepuffer mit 2% *Boehringer blocking reagent* (Roche, Mannheim, Deutschland) und 20% hitzeinaktiviertem Ziegen Serum verhindert wurde. Für die spezifische Färbereaktion an der mit Digoxigenin-markierten mRNA wurde dann der mit einer alkalischen Phosphatase verbundene Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch zwölf Stunden bei  $6^{\circ}\text{C}$  gelagert und überschüssiger Antikörper mit Maleinsäure vorsichtig abgewaschen. Die Färbereaktion mit *BM-Purple* (Roche, Mannheim, Deutschland), welche spezifisch durch die alkalische Phosphatase ausgelöst wurde, dauerte vier Tage im Dunkeln. Die Reaktion wurde mit alkalischem Phosphatasepuffer (100 mM Tris, 100 mM Natriumchlorid, 50 mM Magnesiumchlorid, 2 mM Levamisol, 0,1% Tween 20), gefolgt von PBS gestoppt. Dann wurde der Embryo in Mowiol® (Hoechst, Frankfurt-Höchst, Deutschland) eingebettet, fotografiert und anschließend wie oben beschrieben weiter prozessiert.

## 2.3 *Arbeitsablauf der dreidimensionalen Rekonstruktion (3DR)*

Der Bereich um den Primitivknoten der jeweiligen Embryonen sollte zusätzlich digital rekonstruiert werden, um die räumlichen Zusammenhänge der Strukturen besser verstehen zu

können. Die hierfür nötigen Fotografien der Schnitte wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop und einer Zeiss AxioCam MRc ausgeführt. Dies resultierte in TIFF Dateien (*tagged image file format*) mit einer Auflösung von 1388x1040 Pixeln. Die abgedruckten Fotografien der Schnitte in dieser Arbeit werden entweder von links (für sagittale Schnitte), oder von kaudal (für transversale Schnitte) betrachtet. Das *alignment* der Schnitte, also das möglichst deckungsgleiche Aneinanderfügen der Schnitte in der dritten Dimension (der z-Achse), wurde händisch mittels der open-source Software „Fiji- ImageJ –win64“ und dem Plugin „TrakEM2“ (Schindelin et al. 2012) ausgeführt. Gleiches gilt für die digitale Segmentierung, was das Umfahren und Auswählen der in der Rekonstruktion mit derselben Farbe vertretenen Bereiche bezeichnet. Besondere Aufmerksamkeit war bei der Interpretation der Histologie erforderlich (siehe weiter unten), um der geringen Größe des neurenterischen Kanals und seiner angrenzenden Strukturen gerecht zu werden. Diese genaue und komplexe Aufgabe vermochte bisher kein Algorithmus des Programmes zu leisten. Der korrekte Maßstab der x und y Achse wurde entweder durch ein bekanntes  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$  Verhältnis der Kamera (für die Embryonen 93.2.2; Dobbin; CC10157; GM79.01 und GP09.01.), oder durch in Publikationen gegebene Größenangaben (siehe O’Rahilly und Müller (2006) für CC8671 und Ludwig (1928) für Da1) errechnet. Die Dicke der z Achse ergab sich durch die jeweilige Schnittdicke des Embryos (siehe Tabelle 1). Die Farben der Segmentierung wurden unabhängig von der Herkunftsquelle der Schnitte (eigene Fotografien, Internet, Papierpublikation) angewandt. Blau markiert Neuroektoderm, Rot Mesoderm, Grün die Basalmembran und Lila die Chordaplatte. Für die 3DR von Embryo GM79.01 zeigt Beige die Expressionsdomäne von *Nodal* an, welche in den wenigen überfärbten Schnitten interpoliert wurde. Die Rekonstruktionen wurden anschließend mit den Fotografien der Embryonen vor der histologischen Aufarbeitung, oder bereits vorhandenen Rekonstruktionen anderer Autoren verglichen. Dies geschah anhand der Form der Keimscheibe und sichtbarer Links-/Rechtsasymmetrien. Falls sich zu grobe Abweichungen ergaben, wurden Anpassungen durch ein *re-alignment* vorgenommen. Mittels Adobe Acrobat Pro ([www.adobe.com](http://www.adobe.com)) konnten 3D-pdf-Dateien erstellt werden, die dem Nutzer ein selbstständiges Drehen und Vergrößern bzw. Verkleinern der Rekonstruktionen ermöglichen. Auch ein Spiel mit den Transparenzen der einzelnen Schichten ist möglich. Für die Embryonen GM79.01, GP09.01, 93.2.2 und „Dobbin“ wurden durch Nutzung der Software „MakerBot print“ und des 3D-Druckers „MakerBot replicator<sup>+</sup>“ ([www.makerbot.com](http://www.makerbot.com)) der Bereichsbibliothek Medizin der Niedersächsischen Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen anschließend physische Modelle der zentralen Keimscheibenregion aus verschiedenfarbigem Kunststoff (Polyactide)



erschaffen. Der gesamte Arbeitsablauf der 3DR vom Schneiden des Embryos bis zum fertigen Modell ist in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1 **Methodischer Arbeitsfluss für die 3DR.** (A) Lateraler Stereolupenblick auf den Embryo GM79.01. Der rote Kasten markiert den zu rekonstruierenden Bereich. Der Embryo wird nach Einbettung an einem schematischen Mikrotom geschnitten. Es resultieren drei exemplarische Schnitte 1, 2 und 3, die auf Objektträger verbracht werden. (B) Blick auf die Schnitte durch das Mikroskop. (C) Ausrichten der Schnitte (*alignment*) und Segmentierung (digitales Anfärben der relevanten Bereiche). (D) Digitales Wiederausführen der Schnitte, beginnend mit Schnitt 1, um der Anschnitttrichtung und damit einer wahrheitsgemäßen Links-/Rechtsorientierung Rechnung zu tragen. (E) Entstandenes Modell nach Glättung. (F) Einspeisen der Daten in einen 3D-Drucker. (G) Physisches Modell aus schwarzem Kunststoff der Primitivknotenregion des Embryos GM79.01 in der Hand des Autors.

## 2.4 Dreidimensionale Rekonstruktion von mikroskopischen Strukturen

Mikrotome erzeugen histologische Präparate für die Lichtmikroskopie. Die Schnittstärke liegt hierbei meist bei 4 bis 5  $\mu\text{m}$  pro Schnitt. Bei der Rekonstruktion von allein mikroskopisch

sichtbaren Strukturen (*structures of interest*, SOIs) ergaben sich einige Probleme und Herausforderungen, die im Folgenden besprochen werden sollen. Insbesondere, da der in dieser Arbeit behandelte neurenterische Kanal und Chordakanal sogar noch kleiner als die durchschnittliche Schnittdicke eines Mikrotoms sind.

Prinzipiell waren vier Situationen für die Rekonstruktion von kleinen SOIs denkbar. Der theoretische Durchmesser der kanalähnlichen SOI lag dabei gleich 1 (Abbildung 2A). (1) Die Dicke des Schnittes war  $>1$ . Es entstand ein Schnitt, in dem eine kanalähnliche Aufhellung zu erkennen war, die dennoch mit zellulärem Inhalt vom Rand des Schnittes gefüllt war (Abbildung 2B). (2) Die Dicke der Schnitte lag zwischen 1 und 0,5 und die SOI war nicht in der Mitte getroffen. In diesem Fall entstanden zwei aufeinanderfolgende Schnitte, in denen eine kanalähnliche Aufhellung zu erkennen war (Abbildung 2C). (3) Die Dicke der Schnitte lag zwischen 1 und 0,5 und die SOI wurde zufällig mit einem Schnitt in der Mitte getroffen. In diesem Fall entstanden drei aufeinanderfolgende Schnitte. In den äußeren war eine kanalähnliche Aufhellung zuerkennen, in dem mittleren ein komplett leerer, kanalähnlicher Raum ohne jeglichen zellulären Inhalt (Abbildung 2D). (4) Die Dicke der Schnitte war  $<0,5$ . Die SOI wurde damit stets mit einem Schnitt in der Mitte getroffen. In diesem Fall entstand in jedem Fall ein Schnitt mit einem komplett leeren, kanalähnlichen Raum (Abbildung 2E). Bei einer minimal möglichen Schnittdicke von 4 bis 5  $\mu\text{m}$  müsste ein Kanal in jedem Fall einen Durchmesser von 8 bis 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, um unumgänglich in den Schnitten als solcher erkannt zu werden (siehe Fall 4 oben). Kleinere SOIs, wie der neurenterische Kanal, sind daher nur indirekt bei der dynamischen Betrachtung in verschiedenen mikroskopischen Schärfeniveaus eines Schnittes zu erkennen. Hinweise für eine kanalartige Struktur sind fehlende angeschnittene Zellen und eine sichtbare Lumenbegrenzung durch eine Zytoplasmamembran. Um diesen SOIs in den alten und seltenen lichtmikroskopischen Präparaten gerecht zu werden, sind für diese Arbeit zwei Rekonstruktionsmethoden angewandt worden. Erstens die „enge“ Rekonstruktion, bei der nur vollkommen weiße Räume als Kanal rekonstruiert wurden (vgl. Abbildung 2G mit Abbildung 3B und D). Zweitens die „weite“ Rekonstruktion, bei der auch Dichteaufhellungen der extrazellulären Matrix und der Verlauf von Zytoplasmamembranen in verschiedenen mikroskopischen Schärfeniveaus eines Schnittes bei der 3DR berücksichtigt wurden (vgl. Abbildung 2I mit Abbildung 3C und E).

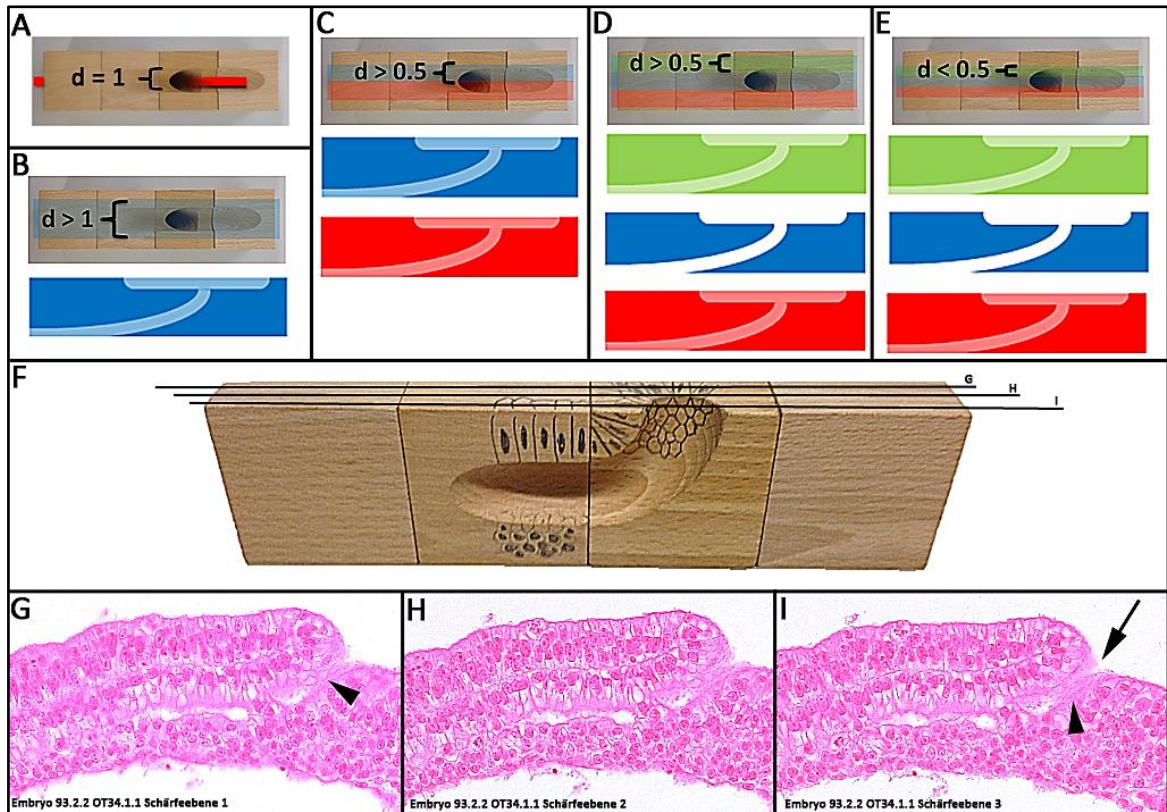


Abbildung 2 **Einfluss von histologischer Schnittdicke und der Einstellung der mikroskopischen Schärfeebene auf die Sichtbarkeit von kleinen SOIs.** (Entnommen aus Rulle et al. (2018), mit freundlicher Genehmigung der S. KARGER AG) **(A)** Dorsale Ansicht einer mit Holzklötzen nachempfundenen Situation ähnlich zu der im Embryo 93.2.2. Von dorsal rechts nach ventral links verläuft eine kanalähnliche, durchgängige SOI (angezeigt durch das rote Band) mit dorsaler Einsenkung und einem Durchmesser von  $d = 1$ . **(B oben)** Dorsale Ansicht eines sagittalen Schnittes mit einer Dicke von  $>1$ . **(B unten)** Der oben entstandene Schnitt in lateraler Ansicht. Es ist eine kanalähnliche Aufhellung zu erkennen, die dennoch mit zellulärem Inhalt vom Rand des Schnittes gefüllt ist. **(C oben)** Dorsale Ansicht zweier sagittaler Schnitte mit einer Dicke zwischen 1 und  $>0,5$ . Die kanalähnliche SOI ist nicht in der Mitte getroffen. **(C unten)** Die oben entstandenen Schnitte in lateraler Ansicht. Es ist jeweils eine kanalähnliche Aufhellung zu erkennen, die dennoch mit zellulärem Inhalt vom Rand des Schnittes gefüllt ist. **(D oben)** Dorsale Ansicht dreier sagittaler Schnitte mit einer Dicke zwischen 1 und  $>0,5$ . Die kanalähnliche SOI ist in der Mitte getroffen. **(D unten)** Die oben entstandenen Schnitte in lateraler Ansicht. In diesem Fall entstehen drei aufeinanderfolgende Schnitte. In den äußeren Schnitten ist eine kanalähnliche Aufhellung zuerkennen, in dem mittleren ein komplett leerer, kanalähnlicher Raum ohne jeglichen zellulären Inhalt. **(E oben)** Dorsale Ansicht dreier sagittaler Schnitte mit einer Dicke von  $<0,5$ . Die kanalähnliche SOI wird in jedem Fall in der Mitte getroffen. **(E unten)** Die oben entstandenen Schnitte in lateraler Ansicht. Es entsteht stets ein Schnitt mit einem komplett leeren, kanalähnlichen Raum. **(F)** Schräg laterale Ansicht einer mit Holzklötzen nachempfundenen Situation ähnlich zu einem in (C) beschriebenen Schnitt. Von dorsal rechts verläuft ein blind endender Kanal ähnlich einem Chordakanal, der den Schnitt nur teilweise ausfüllt. Die schwarzen Linien G, H und I markieren die in (G), (H) und (I) dargestellten Schärfeebenen bei einer mikroskopischen Betrachtung des Embryos 93.2.2, Schnitt OT34.1.1. **(G)** In dieser Schärfeebene ist der dorsale Eingang des Kanals durch apikal angeschnittene Zellen (erkennbar an der Honigwabenstruktur, markiert durch den schwarzen Pfeilkopf) verschlossen. **(H)** Zwischen (G) und (I) liegende Schärfeebene. **(I)** In dieser Schärfeebene ist am dorsalen Eingang des Kanals (markiert durch den schwarzen Pfeil) keine Honigwabenstruktur erkennbar. Hier liegen folglich keine Zellen mehr. Zelluläres Material scheint nur aus den Ebenen (G) und (H) durch. Ebenso ist eine Zytoplasmamembran erkennbar (markiert durch den schwarzen Pfeilkopf), die das Kanallumen begrenzt. Der Eingang zum Kanal ist somit in dieser Schärfeebene als offen zu werten.

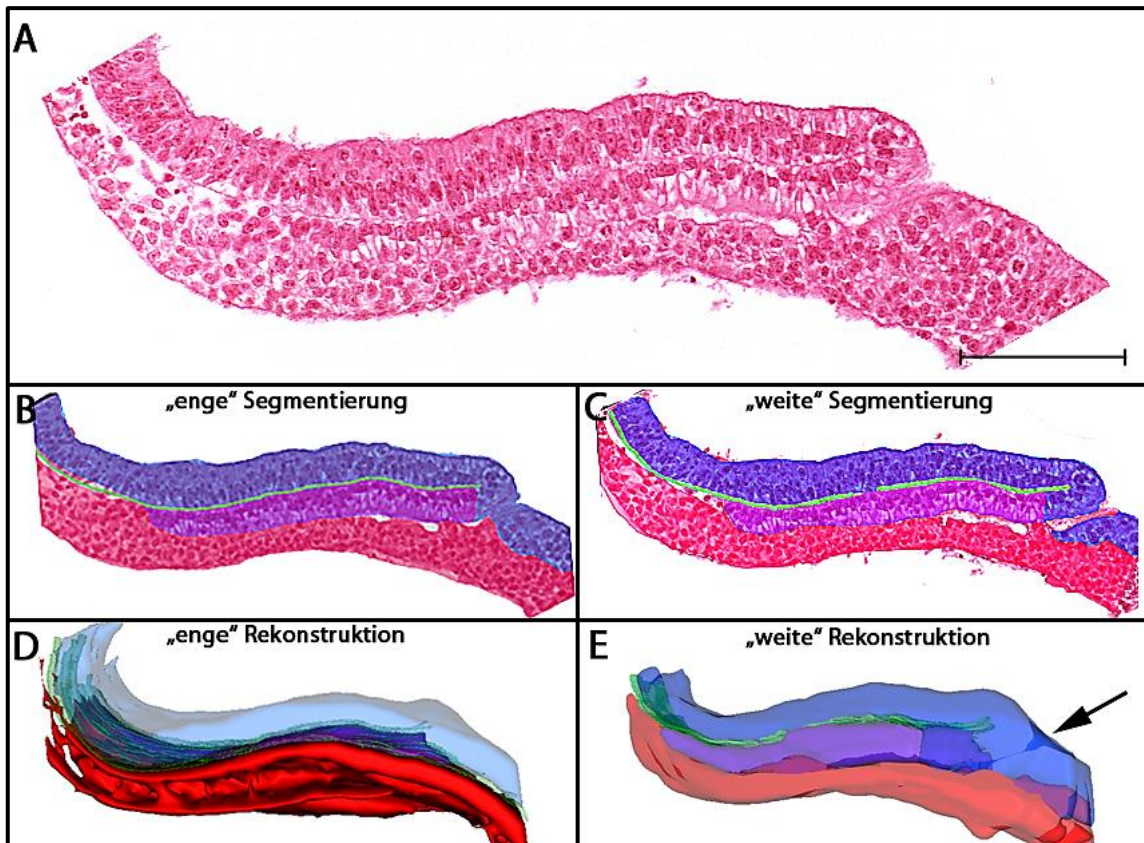


Abbildung 3 **Grundlagen der „engen“ und „weiten“ Rekonstruktion.** (Entnommen aus Rulle et al. (2018), mit freundlicher Genehmigung der S. KARGER AG) (A) Sagittaler Schnitt 34.1.1 des Embryos 93.2.2. in einer Schärfeebene (B) Schnitt A nach „enger“ Segmentierung. Nur komplett weiße Stellen sind nicht gefärbt. (D) Rekonstruktion auf Grundlage der Segmentierung in B. Es ist kein durchgängiger Kanal zu sehen. (C) Schnitt A nach „weiter“ Segmentierung. Auch Dichteaufhellungen der extrazellulären Matrix und der Verlauf von Zytoplasmamembranen in verschiedenen Schärfeebenen wurden berücksichtigt. (E) Rekonstruktion auf Grundlage der Segmentierung in C. Es ist ein durchgängiger Kanal zu sehen (markiert durch den schwarzen Pfeil). Maßstabsbalken: (A) 100  $\mu\text{m}$ , (B) und (C) 170  $\mu\text{m}$ , (D) und (E) 210  $\mu\text{m}$ .

Des Weiteren waren Strukturen, die zwischen zwei unterschiedlich gefärbten SOIs liegen, in der 3DR nur verzerrt oder gar nicht darstellbar, da der Glättungsalgorithmus des Programmes diese nicht als eigenständige, erhaltungswürdige Struktur erkannte. Auch sehr dünne, flächige SOIs, wurden durch den Glättungsalgorithmus nicht korrekt dargestellt. Diese Schnitte wiesen durch in der Präparation unvermeidliche, leichte Schrumpfungsdifferenzen ein *misalignment* – also einen Versatz zueinander – auf. Der Algorithmus konnte diese Versätze nicht auffüllen und die einzelnen Schnitte daher nicht zu einer durchgehenden Fläche verbinden. Um bei diesen SOIs, wie zum Beispiel der Basalmembran, eine weitere Verzerrung zu vermeiden, verblieben sie ungeglättet und erhielten so ein kantiges Aussehen. Mit dem Ziel ein der Histologie entsprechendes Ergebnis in den 3DR zu erhalten, wurde daher Adobe Photoshop ([www.adobe.com](http://www.adobe.com)) zur Nachbehandlung kleiner Abweichungen verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Morphologische Beschreibung der Präparate

In Abbildung 4 sind Ansichten aller in dieser Arbeit behandelten Embryonen versammelt. Diese Zusammenschau ermöglicht eine einfache Übersicht über die räumliche und zeitliche Entwicklung von Chordakanal und neurenterischem Kanal in verschiedenen Stadien und Spezies. Histologie als Grundlage und 3DR als Veranschaulichung stehen gleichberechtigt nebeneinander. Im Folgenden sollen alle Strukturen aber ebenfalls in Worten beschrieben werden. Eine darüber noch hinausgehende, ergänzende wörtliche Beschreibung der Präparate ist in Rulle et al. (2018) erfolgt. Auch sind hier über Abbildung 4 hinausgehende Ansichten der Embryonen präsentiert.

#### 3.1.1 Morphologie der menschlichen Embryonen

Der Embryo 93.2.2 (Stadium 8a) hat eine Keimscheibe mit den Maßen 1,1 x 0,9 mm. Sie ist über den Haftstiel mit dem Chorion, der äußeren Fruchthülle des Embryos, verbunden. Die Keimscheibe liegt zu diesem Zeitpunkt zwischen dem Amnion dorsal und dem Dottersack ventral (Abbildung 4 A1). Die kraniokaudale Achse ist bereits ausgebildet und makroskopisch sichtbar. Diese wird durch den Primitivstreifen kaudal und die Chorda dorsalis kranial angezeigt. Nach der dorsoventralen Achse, die mit der Einnistung festgelegt wurde, ist es damit die zweite, schon sichtbare Körperachse. Die Links-/Rechtsausrichtung ist in diesem Präparat noch nicht durch morphologische Merkmale erkennbar. Die Histologie zeigt eine S-förmige Biegung der Keimscheibe und die drei durch Gastrulation entstandenen, gut abgrenzbaren Keimschichten. In der Medianebene ist das Neuroektoderm an seinen einschichtig hochprismatischen Zellen zu erkennen. Nach lateral und kranial geht das Neuroektoderm ohne erkennbare Grenze in das kubische Amnionepithel über. Im Neuroektoderm selbst sind zahlreiche basal und damit nach ventral ausgerichtete Nuklei mit Nukleolen und Mitosefiguren zu erkennen. Diese zeugen von einer exzellenten Fixierung des Präparates. Ventral hiervon - und durch eine Basalmembran getrennt - liegt die Chordaplatte, die ebenfalls aus einschichtig hochprismatischen Zellen mit basaler und damit nach dorsal ausgerichteten Zellkernen besteht. Beide Schichten, das Neuroektoderm und die Chordaplatte, gehen ungefähr in der Mitte der Keimscheibe durch eine 180 Grad-Kehre des Epithels, eine Involutionbewegung, ineinander über (Abbildung 4 A2). Kranial geht die Chordaplatte in den mesenchymal differenzierten Teil des axialen Mesoderms über. Das mesenchymale axiale

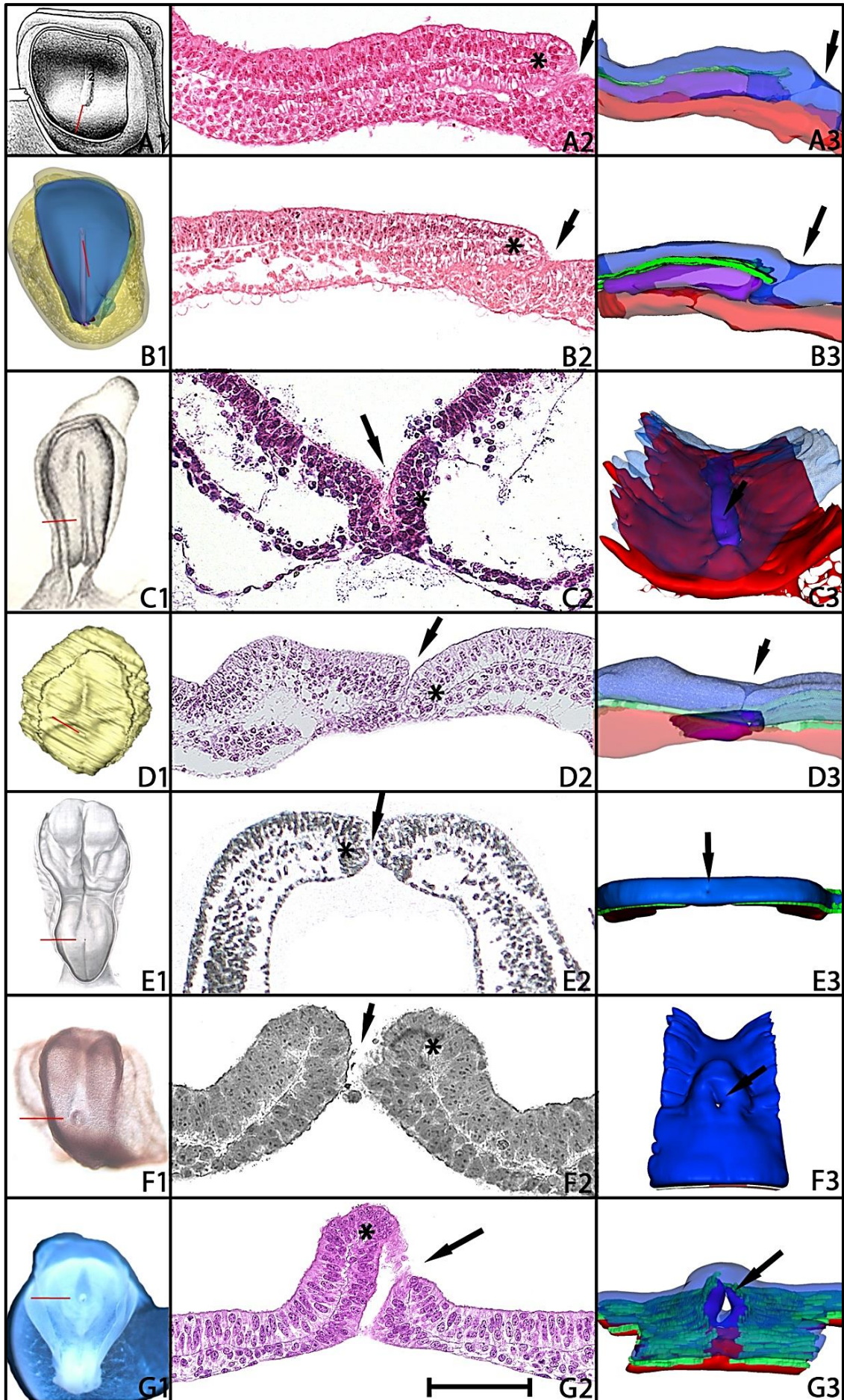


Abbildung 4 **Die untersuchten Embryonen jeweils unter der Ziffer (1) in dorsaler Gesamtansicht („whole-mount view“) im histologischen Schnitt durch den Primitivknoten (Ziffern (2)) und in der 3DR (jeweils Ziffer (3)).** (A1) Dorsale Ansicht des Embryos 93.2.2; 1: angeschnittenes Amnion, 2: Chorda dorsalis, 3: angeschnittener Dottersack. Entnommen aus Sander (2001). Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (A2) Sagittaler Schnitt 34.1.1 des Embryos 93.2.2 mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem longitudinalen Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). (A3) „Weite“ Rekonstruktion des Embryos 93.2.2 in lateraler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem longitudinalen Kanal. (B1) Dorsale Ansicht des Embryos CC8671. Die Keimscheibe ist in Blau, der Primitivstreifen in Lila und der Dottersack in Gelb gezeit. Veröffentlicht in de Bakker et al. (2016). Mit freundlicher Genehmigung von Bernadette de Bakker. Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (B2) Sagittaler Schnitt 95 des Embryos CC8671 mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem longitudinalen Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). (B3) „Weite“ Rekonstruktion des Embryos 93.2.2 in lateraler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem longitudinalen Kanal. (C1) Dorsale Ansicht des Embryos „Dobbin“. Entnommen aus Hill und Florian (1931). Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (C2) Transversaler Schnitt 87 des Embryos „Dobbin“ mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem senkrechten Kanal, der sich longitudinal fortsetzt (markiert durch den schwarzen Pfeil). (C3) „Enge“ Rekonstruktion des Embryos „Dobbin“ in schräg kaudaler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem senkrechten Kanal. (D1) Dorsale Ansicht des Embryos CC10157. Veröffentlicht auf [virtualhumanembryo.lsuhscc.edu](http://virtualhumanembryo.lsuhscc.edu), Disp\_FS. Mit freundlicher Genehmigung von R. John Cork, Ph.D. Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (D2) Schräg transversaler Schnitt 187 des Embryos CC10157 mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem senkrechten Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). (D3) „Weite“ Rekonstruktion des Embryos CC10157 in schräg kaudaler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem senkrechten Kanal. (E1) Dorsale Ansicht des Embryos Da1. Entnommen aus Ludwig (1928). Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (E2) Transversaler Schnitt 183 des Embryos Da1 mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem senkrechten Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). (E3) „Enge“ Rekonstruktion des Embryos Da1 in schräg dorsaler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem senkrechten Kanal. (F1) Dorsale Ansicht des Embryos GM79.01. Veröffentlicht in Rulle et al. (2018). Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (F2) Transversaler Schnitt 30.5 des Embryos GM79.01 mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem senkrechten Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). (F3) „Enge“ Rekonstruktion des Embryos GM79.01 in schräg dorsaler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem senkrechten Kanal. (G1) Dorsale Ansicht des Embryos GP09.01. Veröffentlicht in Rulle et al. (2018). Der rote Strich markiert die Ausrichtung des nebenstehenden histologischen Schnittes. (G2) Transversaler Schnitt 202 des Embryos GP09.01 mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem senkrechten Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). (G3) „Enge“ Rekonstruktion des Embryos GP09.01 in schräg dorsaler Ansicht. Farbgebung gemäß der Beschreibung im Material- und Methodenteil. Der schwarze Pfeil markiert den dorsalen Eingang zu einem senkrechten Kanal. Maßstabsbalken: (A1) 1000 µm, (A2) 110 µm, (A3) 230 µm, (B1) 1000 µm, (B2) 130 µm, (B3) 120 µm, (C1) 800 µm, (C2) 130 µm, (C3) 470 µm, (D1) 900 µm, (D2) 150 µm, (D3) 170 µm, (E1) 1420 µm, (E2) 160 µm, (E3) 310 µm, (F1) 890 µm, (F2) 50 µm, (F3) 210 µm, (G1) 1240 µm, (G2) 90 µm, (G3) 150 µm.

Mesoderm ist an seinen runden Zellkernen und dem diffusen Verteilungsmuster dieser zu erkennen. Dieses direkt unter der Chordaplatte gelegene Mesoderm passt in die für Huhn und Säugetier aufgestellte Definition des SCM. Die Chordaplatte und das SCM sind durch eine 180  $\mu\text{m}$  lange maximal 20  $\mu\text{m}$  weite und 10  $\mu\text{m}$  hohe, unregelmäßige und kanalähnliche Struktur getrennt, die hinter dem Umbördelungspunkt eine direkte Verbindung zur Amnionhöhle hat. Unter dem SCM wiederum liegt das einschichtige Plattenepithel des Hypoblasten, das ebenfalls ohne genaue Grenze in das Dottersackepithel am Ende der Keimscheibe übergeht. Kaudal der Öffnung der kanalähnlichen Struktur liegt der Bereich des Primitivstreifens, zu erkennen an einer medianen Rinne im Epithel. Weiterhin besteht das Epithel, das rechts von der Öffnung des Kanals liegt und die rechte Primitivknotenschulter darstellt, aus mehr Zelllagen mit runderen Zellkernen als die linke Knotenschulter. In der 3DR des Embryos 93.2.2 sind zum einen die dorsale Öffnung des Kanals und sein Verlauf in der „weiten“ Rekonstruktion zu erkennen, zum anderen ebenfalls der Primitivstreifen (Abbildung 4 A3). Auch hier erscheint die rechte Knotenschulter höher und steiler abfallend als die linke. Des Weiteren ist in einer lateralen Ansicht der Umbördelungspunkt als Bereich zwischen Neuroektoderm dorsal und Chordaplatte ventral zu sehen. Der Übergangspunkt wurde hierbei dort definiert, wo das Epithel nach der Involution wieder senkrecht auf der Basalmembran steht. Im Folgenden werden nur die von den Beobachtungen am Embryo 93.2.2 abweichenden Befunde ausgiebiger besprochen, um Redundanzen zu vermeiden. Die Keimscheibe des Embryos CC8671 (Stadium 8a) ist birnenförmig und 1,38 mm lang. Die Schnittachse weicht von der genauen Sagittalachse des Embryos um etwa zehn Grad nach rechts ab (Abbildung 4 B1). In der histologischen Begutachtung zeigt sich ein 145  $\mu\text{m}$  langer, 40  $\mu\text{m}$  weiter und 6  $\mu\text{m}$  hoher Kanal zwischen Chordaplatte und SCM mit dorsaler Öffnung zur Amnionhöhle. Kranial hiervon liegt ein Umbördelungspunkt mit einer Involutionbewegung des Epithels, kaudal schließt sich der Primitivstreifen an (Abbildung 4 B2). Das Ektoderm erscheint in Höhe und Zellkernform symmetrisch in beiden Knotenschultern. Interessanterweise sind nahe der Medianebene des Embryos zwei trichterförmige Einsenkungen in dem Hypoblasten zu erkennen. Mit Bezugnahme auf die Theorie des sich zurückziehenden SCM im Verlauf des Stadiums 8 können diese Einsenkungen als ventrale Öffnungen des Kanals hin zum Dottersack betrachtet werden. Die 3DR zeigt den Kanal, das beinahe symmetrische Ektoderm und den Umbördelungspunkt in einer lateralen Ansicht der „weiten“ Rekonstruktion (Abbildung 4 B3).

Der Embryo „Dobbin“ ist dem Stadium 8b zuzuordnen und misst 0.98 mm in der Mitte seiner birnenförmigen Keimscheibe (Abbildung 4 C1). Die weniger gut abgrenzbaren Zytoplasmamembranen und intrazellulären Strukturen weisen auf einen weniger guten



Erhaltungszustand hin. Dennoch ist am kaudalen Ende der etwa 360  $\mu\text{m}$  messenden Chordaplatte eine ektodermale Öffnung zu einem fast senkrechten Kanal zu erkennen. Dieser setzt sich durch alle drei Keimscheibenschichten hindurch fort. Er misst ungefähr 6  $\mu\text{m}$  mal 4  $\mu\text{m}$  und ist ventral mit dem Dottersack verbunden (Abbildung 4 C2). Nach kranial setzt sich der senkrechte Kanal noch longitudinal zwischen Chordaplatte dorsal und irregulären Zellen des SCM ventral fort. Es sind drei weitere abgrenzbare Verbindungen dieses longitudinalen Kanals zum Dottersack zu erkennen. Zum größten Teil hat die Chordaplatte auch direkten Kontakt zum Dottersack. In den Transversalschnitten ist zu erkennen, dass sich der kranial vom senkrechten Kanal gelegene Umbördelungspunkt hufeisenartig nach lateral fortsetzt und hier ebenfalls eine Involutionbewegung des Epithels stattfindet. Das rechts vom senkrechten Kanal gelegene Neuroektoderm ist auf einer Länge von ca. 120  $\mu\text{m}$  nahezu doppelt so hoch und enthält doppelt so viele Zellkerne wie das linksseitige Ektoderm. In der 3DR ist dies anhand eines Aufragens des Ektoderms auf der rechten Seite des Embryos zu sehen. Auch der beinahe senkrechte Verlauf des Kanals, der ventral fast vollständig von der entstehenden Chordaplatte eingefasst wird und die drei ventralen Öffnungen des Kanals weiter kranial sind erkennbar (Abbildung 4 C3).

Der zweite, etwas ältere Embryo des Stadiums 8b heißt CC10157 und besitzt eine Keimscheibe mit einem Durchmesser von 1,16 mm (Abbildung 4 D1). Trotz eines Präparationsartefaktes ist er ebenfalls exzellent erhalten ([virtualhumanembryo.lsuhs.edu](http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu), Intro). Die Schnittachse weicht von der genauen Transversalachse um etwa zwanzig Grad nach rechts ab. Im kaudalen Drittel verläuft ein Kanal beinahe senkrecht von kaudal rechts nach kranial links durch die gesamte Keimscheibe (Abbildung 4 D2). Dies ist in drei aufeinander folgenden Schnitten gut zu erkennen. Der Durchmesser des Kanals beträgt ca. 4  $\mu\text{m}$ . Kranial und lateral dieses Kanals ist ein Umbördelungspunkt erkennbar. Die hier involutierten, epithelialen Zellen der entstehenden Chordaplatte fassen den Kanal ventral komplett ein. Die insgesamt 650  $\mu\text{m}$  lange Chordaplatte selbst hat in ihrem weiteren Verlauf freien Kontakt zum Dottersack. An ihrem kranialen Ende sind Reste eines, wenn auch schwierig abzugrenzenden, longitudinalen Kanals erkennbar. Der durch die Herausgeber angegebenen Links-/Rechtsorientierung folgend, liegt im linken parachordalen Ektoderm eine Verdickung des Epithels mit einer numerischen Häufung von Zellkernen auf einer Länge von 130  $\mu\text{m}$  vor. Diese Asymmetrie ist ebenfalls in der 3DR zu erkennen (Abbildung 4 D3). Ebenso der schräge Verlauf des senkrechten Kanals in der „weiten“ 3DR und eine artifizielle Abhebung der Basalmembran auf der linken Seite, die auch auf der Ursprungsinternetseite beschrieben wurde ([virtualhumanembryo.lsuhs.edu](http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu), Disp\_FS).

Die Keimscheibe des Embryos Da1 (Stadium 9) misst 2,1 mm mal 1,2 mm. In der Mitte ist bereits das erste, sich entwickelnde Somitenpaar abgrenzbar. Weiter kranial imponieren die ersten Auffaltungsbewegungen des Neuroektoderms im Zuge der Neurulation (Abbildung 4 E1). Es ist der älteste in dieser Studie untersuchte Embryo. Die schon in der durch den Erstbeschreiber angefertigten Rekonstruktion sichtbare, dorsale, runde Öffnung im hinteren Drittel der Keimscheibe stellt sich in den transversalen Schnitten als Zugang zu einer kanalähnlichen, senkrechten Struktur dar. Dieser Kanal durchtritt alle Keimscheibenschichten. Die ventrale Öffnung des Kanals ist vollends von epithelialen Zellen der Chordaplatte umgeben (Abbildung 4 E2). Diese Zellen drehen sich in einem in den Transversalschnitten gut beurteilbaren Bereich lateral des Kanals um 180 Grad ein, involutieren also. Direkt kranial des Kanals erscheint die rechte Knotenschulter, die aus bis zu fünf, eher rundlichen Zellschichten besteht. Sie ragt damit höher auf als die linke Knotenschulter, die weniger Zellschichten aufweist. Der beinahe senkrechte Verlauf des Kanals sowie seine rundherum epitheliale Einfassung sind ebenfalls in der 3DR zu sehen (Abbildung 4 E3).

### 3.1.2 Morphologie der *Callithrix*-Embryonen

Der Embryo GM79.01 (Stadium 8b) besitzt zwischen dem abpräparierten Amnionepithel und dem Dottersack eine Keimscheibe mit den Maßen 1,2 mm mal 0,68 mm. Schon in den vor der Präparation aufgenommenen Stereolupenbildern ist der Primitivknoten zwischen der Chordaplatte kranial und dem Primitivstreifen kaudal sichtbar. Er erscheint als in der Kraniokaudalachse gelegene Erhöhung (Abbildung 4 F1) und besitzt eine steile rechte und eine weniger steile linke Knotenschulter. In den Transversalschnitten ist das hochprismatische Ektoderm mit gut abgrenzbaren Nuklei und Nukleolen zu erkennen, das auf beiden Knotenschulterseiten involutiert. Es formt so die nach kranial auswachsende Chordaplatte. Diese ist 650 µm lang und maximal 140 µm breit und hat direkten Kontakt zum Dottersack. Zwischen den Knotenschultern mit den Umbördelungspunkten ist ein beinahe senkrechter Kanal erkennbar, der die Amnionhöhle mit dem Dottersack verbindet. In seiner ventralen Öffnung liegen einige, während der Präparation abgeschilferte Zellen. Dorsal ist der Kanal selbst vollkommen von epithelial differenzierten Zellen des Neuroektoderms kranial und des Primitivstreifens kaudal umgeben (Abbildung 4 F2). Er ist 40 µm lang und 8 µm weit. Das Ektoderm der linken Knotenschulter ist dabei höher und enthält mehr und eher rund erscheinende Zellkerne. Die ventrale Öffnung des Kanals ist im lateralen und kranialen Bereich von einem epithelialen Trichter der entstehenden Chordaplatte eingefasst. Kaudal dagegen liegen Zellen des Primitivstreifens, dem Bereich wo Ekto-, Meso-, und Endoderm durch Gastrulation entstehen. Die 3DR zeigt einen durchgängigen, fast senkrechten Kanal

zwischen den zwei Knotenschultern, von denen die rechte breiter und steiler abfallend ist als die linke (Abbildung 4 F3). Die Chordaplatte fasst den Kanal zu drei Vierteln von kaudal ein. Der Bereich des Primitivstreifens ist durch eine fehlende Basalmembran abgrenzbar.

Die Keimscheibe des Stadium 9 Embryos GP09.01 misst 2,1 mm mal 1,2 mm. In den Stereolupenbildern ist sowohl ein erstes Somitenpaar, als auch ein hoch aufragender Primitivknoten mit einem schräg verlaufenden Kanal in der Mitte zu erkennen (Abbildung 4 G1). Die Transversalschnitte zeigen, dass dieser einen um zehn Grad nach rechts von der Senkrechten abweichenden Verlauf hat. Er verbindet das Amnionepithel mit dem Dottersack und misst 20  $\mu\text{m}$  mal 13  $\mu\text{m}$ . Ventral ist dieser Kanal komplett von epithelialen Zellen der Chordaplatte, dorsal von epithelialen Zellen des Neuroektoderms umgeben (Abbildung 4 G2). Kranial des Kanals fehlt in der rechten Knotenschulter die Basalmembran, die Zellen sind hier recht diffus verteilt und in mehr Lagen als in der linken Seite arrangiert. Diese Asymmetrien, der schräg verlaufende Kanal und sein ventraler, aus Chordaplattenzellen bestehender Trichter, sind ebenfalls in der 3DR zu sehen (Abbildung 4 G3).

### 3.2 Asymmetrische *Nodal*-Expression im *Callithrix*-Embryo GM79.01

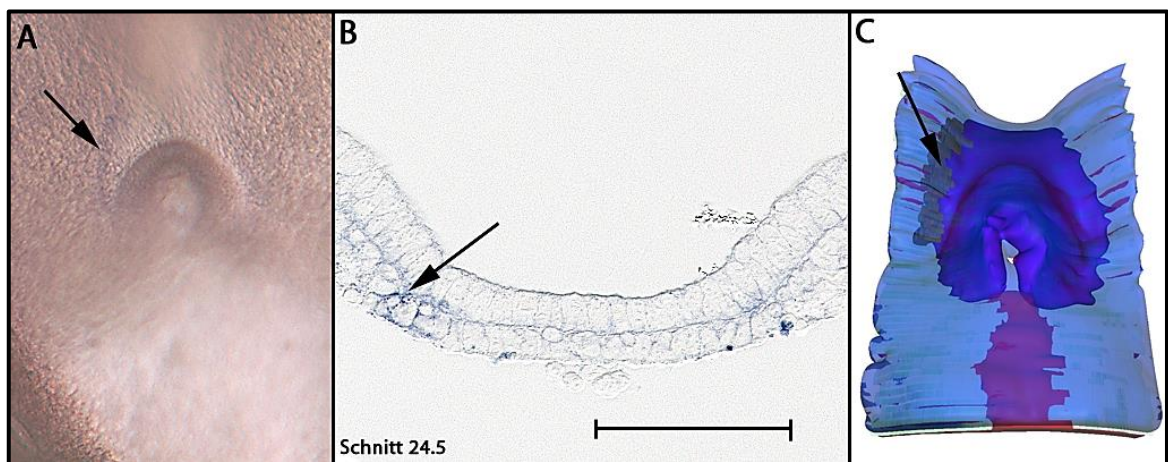


Abbildung 5 **Asymmetrische *Nodal*-Expression im Embryo GM79.01.** (Entnommen aus Rulle et al. (2018), mit freundlicher Genehmigung der S. KARGER AG) (A) Dorsale Stereolupenansicht. Links-lateral des Primitivknotens ist eine blaue Expressionsdomäne sichtbar (markiert durch den schwarzen Pfeil). (B) Transversaler Schnitt 24.5 kranial des Primitivknotens. Links ist eine blaue Expressionsdomäne sichtbar (markiert durch den schwarzen Pfeil). (C) Schräg dorsale 3DR. Links-lateral des Primitivknotens ist eine gelb dargestellte *Nodal*-Expressionsdomäne sichtbar (markiert durch den schwarzen Pfeil). Maßstabsbalken: (A) 220  $\mu\text{m}$  (B) 100  $\mu\text{m}$  (C) 180  $\mu\text{m}$ .

Neben der morphologischen Asymmetrie, die für den Embryo GM 79.01 beschrieben wurde, ergab die WISH im linken paraxialen Mesoderm neben der Chordaplatte eine asymmetrische *Nodal*-Expression. Diese zeigt eine bereits etablierte molekulare Asymmetrie im Embryo an. Die Expressionsdomäne reicht vom kranialen Rand des Primitivknotens bis 140

µm nach kranial (Abbildung 5A). Obwohl in den Transversalschnitten auch eine ganz leichte *Nodal*-Färbung im rechten paraxialen Mesoderm zu sehen war, wurde diese als zu schwach erachtet, um Eingang in eine 3DR zu finden (Abbildung 5B). So ist in dieser nur die linke Expressionsdomäne mit ihrer engen Verbindung zur Chordaplatte zu sehen (Abbildung 5C).

## 4 Diskussion

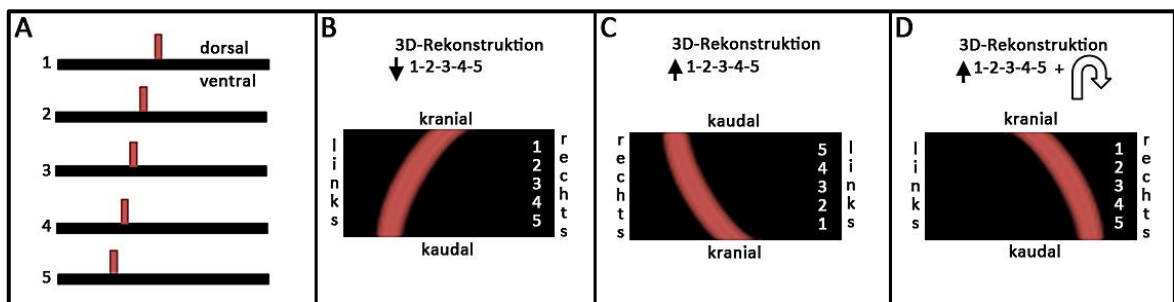
Durch die Korrelation von exzellent erhaltenen Embryonen mit historischen Embryonen ist bei allen sieben in dieser Arbeit untersuchten Exemplaren eine kanalartige Struktur in der Histologie nachweisbar. Diese liegt in direkter Nähe zu dem Primitivknoten und zu der entstehenden *Chorda dorsalis*. Im Folgenden soll gezeigt werden, dass dieser Kanal als neurenterischer Kanal beziehungsweise dessen Vorläuferstruktur anzusehen ist. Unmittelbar kranial und lateral des Primitivknotens zeigt das Neuroektoderm typische morphologische Merkmale der Involution. Häufig sind auch morphologische Asymmetrien erkennbar: Die rechte Primitivknotenschulter ist größer und in mehr Zellschichten organisiert als die linke. Das Gen *Nodal* ist bei *Callitrix* im linken paraxialen Mesoderm nachweisbar und exprimiert damit bereits in einem frühen Stadium asymmetrisch. Sowohl der Kanal, die morphologischen Asymmetrien und ihre enge räumliche Nachbarschaft sind in den angefertigten 3DR sichtbar.

### 4.1 Überlegungen zum Nutzen der dreidimensionalen Rekonstruktion (3DR)

Die vergleichende Histologie führt tatsächlich zu dem eindeutigen Existenznachweis eines neurenterischen Kanals bei *Callitrix* und Mensch. Durch die dreidimensionale Rekonstruktion wird die räumliche Beurteilung der genauen topographischen Lage- und Größenverhältnisse von neurenterischem Kanal, Primitivknoten und Chordaplatte ermöglicht. Die Modelle sind dabei interaktiv gestaltet und verbinden in der Darstellung mikroskopische Detailschärfe mit makroskopischen Zusammenhängen. (Arganda-Carreras et al. 2010; de Bakker et al. 2016). Sie stehen in der langen Traditionslinie der dreidimensionalen Rekonstruktion für embryologische Zwecke (Born G 1883; Gühr 1961).

Ein Problem stellt jedoch die korrekte Darstellung der Links-/Rechtsachse in den frühen Embryonen dar, für die bisher keine von den beiden anderen Achsen unabhängige, morphologische Bestimmung möglich ist. Sollen nämlich in der Histologie neu beobachtete Asymmetrien nun mit einer wirklichkeitsgetreuen Ausrichtung beschrieben werden, können diese durch ein Aneinanderreihen a) „aus der Bildebene heraus“ (zum Beobachter hin), oder b) „in die Bildebene hinein“ (vom Beobachter weg), bei der Rekonstruktion vertauscht werden (vgl. Abbildung 6B und D). Eine eindeutige Links-/Rechtsorientierung ist in diesem Fall nur zu erreichen, wenn bei bekannter Arbeitsweise des Mikrotoms und eines einheitlichen Übertrags der Schnitte auf die Objektträger die Anschnittrichtung des Präparates bekannt ist. So ist nur eine Rekonstruktionsweise möglich. Die Anschnittrichtung ist bei nicht eigens

prozessierten Embryonen leider oft unbekannt. Allerdings sollte jeder sorgfältig arbeitende Präparator die Nummerierung der Objektträger (und damit der Schnitte) mit einer Eins beginnen und so den Anschnittpol markieren. Ein Beginn der Rekonstruktion mit dem ersten Schnitt auf dem ersten Objektträger sollte somit in der Regel zu einer korrekten Links-/Rechtsausrichtung der 3DR führen. Die Plausibilität dieser Maßnahme ist für den Embryo „Da1“ nachgewiesen. Hier weist eine frühere, durch den Erstbeschreiber angefertigte, analoge Rekonstruktion dieselbe Links-/Rechtsausrichtung auf, wie die für diese Arbeit erstellte. Für den Embryo CC10157 kann wegen der gegenläufigen Beschriftung von Objektträgern und Schnitten keine eindeutige Rekonstruktion angefertigt werden. Die in dieser Arbeit gezeigten 3DR folgen den bereits durch andere Autoren erstellten.



**Abbildung 6 Die Abhängigkeit der Links-/Rechtsausrichtung eines Embryos von der Rekonstruktionsweise.** (Entnommen aus Rulle et al. (2018), mit freundlicher Genehmigung der S. KARGER AG) (A) Fünf schematische, transversale Schnitte eines Embryos mit dorsaler, roter SOI, die sich durch die Schnitte von median nach lateral bewegt. Schnitt 1 stellt das kraniale Ende und Schnitt 5 das kaudale Ende des Embryos dar. Ebenso ist die dorsoventrale Ausrichtung des Embryos morphologisch eindeutig zu bestimmen. (B) Dorsale Ansicht einer Rekonstruktion nach Aneinanderfügen der Schnitte „aus der Bildebene heraus“ (zum Beobachter hin), beginnend mit Schnitt 1. Die rote SOI zeigt eine Tendenz nach links lateral. (C) Dorsale Ansicht einer Rekonstruktion nach Aneinanderfügen der Schnitte „in die Bildebene hinein“ (vom Beobachter weg), beginnend mit Schnitt 1. (D) Rekonstruktion C um 180 Grad gedreht. Die rote SOI zeigt eine Tendenz nach rechts lateral. (B) und (D) verhalten sich nur durch eine unterschiedliche Prozessierung in der 3DR spiegelbildlich zueinander. Beachtet man die Arbeitsweise eines Mikrotoms und setzt den Schnitt 1 mit dem Anschnittpol gleich, so bleibt nur (C) und damit (D) als wirklichkeitstgetreue Rekonstruktion. Die rote SOI liegt am rechten Rand des Embryos.

Berücksichtigt man ein paar Punkte, so ist die virtuelle Rekonstruktion dennoch gut für Strukturen geeignet, die sogar kleiner als die ursprüngliche Schnittdicke der histologischen Präparate sind: 1) Die Etablierung einer „weiten“ und „engen“ Rekonstruktion helfen auch Strukturen, die schwierig zu interpretieren sind (wie den neurenterischen Kanal), zu erfassen und korrekt darzustellen. Eine auch ungewollte subjektive Verzerrung der Gegebenheiten, entweder eine „Überinterpretation“, oder ein „Verschwinden lassen“, wird durch die gleichwertige Darstellung in zwei Ausprägungen vermieden. Dennoch liegt beiden Rekonstruktionsmethoden ein nachvollziehbarer Algorithmus zugrunde, der die Reproduzierbarkeit erhöhen soll. 2) Jede SOI sollte separat mit einer eigenen Farbe

rekonstruiert werden, um nicht zwischen den anderen Strukturen zu verschwinden. 3) Dünne, flächige SOIs können mit dem verwendeten Programm „Fiji- ImageJ –win64“ nur unzureichend geglättet werden. Eventuell kann ein kostenpflichtiges Programm, oder ein – bei ausreichenden Programmierkenntnissen selbst geschriebenes – neues Plugin diese Anforderung besser erfüllen. 4) Eine wirklichkeitsgemäße Links-/Rechtsausrichtung der Rekonstruktionen lässt sich nur sicherstellen, wenn die Anschnittrichtung des Embryos am Mikrotom zweifelsfrei dokumentiert, oder am besten selbst eingestellt wurde.

Die so entstandenen virtuellen Rekonstruktionen sind leicht in 3D-pdf-Dateien konvertierbar und damit Interessierten zugänglich. In einem nächsten Schritt können die Rekonstruktionen ebenfalls mit einem 3D-Drucker in ein physisches Modell verwandelt werden. Diese durch jeden Interessierten selbst ausführbare Methode ist kostengünstig und konkretisiert unmittelbar sonst eher abstrakt wirkende embryologische Fragestellungen. Geeignete Drucker sind häufig in sogenannten *makerspaces* öffentlich zugänglich. Ein Beispiel sind die 3D-Drucker der Bereichsbibliothek Medizin der SUB. Zusätzlich wird so der interaktive Umgang mit dieser zum Beispiel in operativen Fächern an Bedeutung gewinnenden Technologie geschult (Ventola 2014). Da einem embryologisches Verständnis weiterhin eine enorme Bedeutung in der heutigen medizinischen Ausbildung zukommt (Carlson 2002; Zaletel et al. 2016), können physische Modelle helfen die Motivation und Leistung der Studenten zu verbessern (Aversi-Ferreira et al. 2012). Auch wird der Zugang für junge Ärzte, die in der Gynäkologie, Pädiatrie und Neurochirurgie erstmals erneut Berührungspunkte zu aus der Embryologie ableitbaren Pathologien haben, verbessert. Mehrfarbige Drucksysteme können dabei den pädagogischen Effekt noch erhöhen, gehen allerdings auch mit einer Kostensteigerung und teils mit der Notwendigkeit der Umkapselung der Drucksysteme einher, da toxische Gase entstehen können (Wojtyła et al. 2017).

## 4.2 Die Existenz des neurenterischen Kanals und des Chordakanals

In den menschlichen Embryonen „Dobbin“, CC10157 und Da1 sowie den *Callithrix*-Embryonen GM79.01 und GP09.01 kann die beinahe senkrechte, vollständig von Epithel umschlossene Verbindung zwischen Amnionhöhle und Dottersack im Primitivknoten gemäß den Definitionen von von Spee (1889), Grosser (1924) und O’Rahilly und Müller (1987) als neurenterischer Kanal bezeichnet werden. Dieser entsteht im Stadium 8b und bleibt bis ins frühe Stadium 9 zwar als kurzlebige, aber dennoch durchgängige Struktur erhalten. Ausgehend von dieser Feststellung können auch die Beobachtungen eines neurenterischen Kanals an schlecht fixierten, menschlichen Präparaten wie dem Embryo Gle (von Spee 1889) Embryo

H3 (Wilson 1914), Peh.1 (Rossenbeck 1923) oder R.S. (Odgers 1941) bestätigt werden. Es scheint somit gesichert, den neurenterischen Kanal abschließend als physiologische Struktur der menschlichen Entwicklung betrachten zu können. Ergebnisse von Selenka (1900) an Mangaben und Gibbons, Heuser und Streeter (1941) und Tamarin (1983) an Makaken, Hendrickx (1971) an Pavianen und *Callithrix jacchus* (diese Arbeit) legen nahe, dass der neurenterische Kanal ebenso in der Entwicklung von anderen Primaten auftritt. In Übereinstimmung mit früheren Vermutungen (Grosser 1924) entwickelt sich der neurenterische Kanal dabei aus einer Vorläuferstruktur, dem Chordakanal. Der Chordakanal stellt sich in den menschlichen Embryonen CC8671, 93.2.2 und „Dobbin“ als longitudinaler Kanal zwischen noch intaktem SCM und der Chordaplatte dar, wie ursprünglich durch Lieberkühn (1882), Strahl (1916), Rossenbeck (1923) und O’Rahilly und Müller (1981) beschrieben. Der Embryo „Dobbin“ stellt dabei eine Zwischenstufe zwischen 8a und 8b dar, bei der das ventrale SCM bereits an einigen Stellen in Auflösung begriffen ist. Der Chordakanal zeigt somit bereits mehrere ventrale Verbindungen zum Dottersack auf, wobei die kaudalste hiervon bereits den neurenterischen Kanal bildet. Durch diese Desintegration des subchordalen Mesoderms erhält die Chordaplatte folglich im Stadium 8b einen direkten Kontakt zum Dottersack.

Dem Verdacht, dass einer Persistenz des neurenterischen Kanals über das Stadium 9 hinaus eine ursächliche Bedeutung für axiale Malformationen des Fetus und des Neugeborenen zukommt, kann mit den in dieser Arbeit versammelten Beobachtungen erstmals eine Grundlage gegeben werden. Möglicherweise hat der Schweregrad und die Zeitdauer der Persistenz dabei einen Einfluss auf die sich entwickelnde Pathologie. Für neuroendodermale Zysten ist eine eher kurzzeitige Persistenz denkbar, in der der neurenterische Kanal den endodermalen Stammzellen als Migrationsroute für eine Ansiedlung entlang des zentralen Nervensystems dient. Hierbei würde er allerdings nicht die strukturelle Entwicklung der umgebenden Strukturen behindern (Dady et al. 2014; Eibach et al. 2017; Schmidt et al. 2017; Florea et al. 2018). Eine längere Persistenz, vor allem des dorsalen Abschnittes des neurenterischen Kanals, könnte eine Fusion des Neuralrohres mit dem Bereich der sekundären Neurulation verhindern. So erklärten sich *junctional neurulation defects* mit zwei nicht fusionierten Rückenmarkskonen (Dady et al. 2014; Eibach et al. 2017; Schmidt et al. 2017; Florea et al. 2018). Eine dauerhafte und vollständige Persistenz schließlich würde eine pathologische und nur kurzzeitig mit dem Leben vereinbare Verbindung zwischen Bauchhöhle und Rückenwand schaffen. Damit könnten sie den Symptomkomplex von Darmherniationen durch eine dorsale Rückenfistel, das *split notochord syndrome*, bedingen (Bentley und Smith 1960; Singh und Singh 1982; Gupta und Deodhar 1987; Dhawan et al.



2017). Experimentelle Studien an *Cynopus pyrrhogaster*, einer Salamanderart, bestätigen, dass ein *split notochord syndrome* mechanisch bedingt sein kann (Emura et al. 2000; Emura et al. 2003). Diese Pathologien treten recht konstant zwischen dem zwölften Thorakalwirbelkörper und dem zweiten bis dritten Lumbalwirbelkörper auf und sind damit gut durch eine singuläre Störungsursache im höhengleichen Bereich des Primitivknotens erklärbar. Für variabelere Malformationen wie die Spina bifida, die entlang der gesamten unteren Wirbelsäule auftreten kann (Oakeshott et al. 2015), oder den allein im Sakralbereich verorteten Sacrococcygealfisteln (Kanat und Sözen 2015) ist ein Einfluss des neurenterischen Kanals dagegen unwahrscheinlich (Kallet 1940; Hueston 1953). Bei letzteren fehlt zusätzlich eine Beteiligung von Darmgewebe. Diese wäre jedoch bei einer kompletten Persistenz des neurenterischen Kanals anzunehmen.

### 4.3 Die Homologie des neurenterischen Kanals zum Blastoporus

Die gemeinsame Untersuchung von Medianschnitten und Transversalschnitten der sieben oben beschriebenen Embryonen weist in allen Embryonen eine hufeisenförmige „Umbördelungsbewegung“ des Neuroektoderms im Bereich des im Primitivknoten gelegenen neurenterischen Kanals nach. In Anlehnung an den Begriff „*chordoneural hinge*“ (Pasteels 1943; Gont et al. 1993; Cambay und Wilson 2002), der einen morphologisch ähnlichen Bereich mit Stammzellaktivität in späteren Stadien von Krallenfrosch und Maus beschreibt, und der Nomenklatur von Gilbert und Barresi (2016) wird dieser Punkt der Involution *hinge of involuting notochord cells* (HINC) genannt. Durch eine hufeisenförmige zelluläre Involutionbewegung im HINC entsteht im Stadium 8 die nach kranial auswachsende Chorda dorsalis. Diese fasst den bis ins Stadium 9 nachweisbaren neurenterischen Kanal ventral trichterförmig ein. Funktionell wie morphologisch lässt sich somit die These der Homologie des neurenterischen Kanals mit (Teilen des) Blastoporus erneuern (Hoffmann 1883; von Beneden 1888). Die typische Involutionbewegung, durch die am HINC die Chorda dorsalis entsteht, findet sich in Säugetieren wie Primaten (Rulle et al. 2018) und Fledermäusen (von Beneden 1888), Reptilien (Bertocchini et al. 2013; Arias et al. 2017), Amphibien (Shook und Keller 2008) einigen Vogelspezies (Schauinsland 1903) und damit in der gesamten Reihe der Landwirbeltiere. Aktuelle Untersuchungen legen darüber hinaus die Vermutung nahe, dass sich der Primitivstreifen in Säugetieren und Vögeln unabhängig voneinander entwickelt haben könnte. Der Blastoporus der Reptilien könnte hierbei eine Art Zwischenstufe zwischen beiden Varianten, einen „Vorläuferstreifen“, darstellen (Bertocchini et al. 2013; Arias et al. 2017). Auch der Amphibienblastoporus ähnelt lateral und kaudal funktionell eher dem Primitivstreifen. Die Variabilität der Gastrulation innerhalb der Landwirbeltiere scheint komplexer und dynamischer zu sein als bisher angenommen. Dennoch ist eine gemeinsame

Vorläuferstruktur denkbar, von der aus sich diese Abstufungen entwickelt haben könnten. Bei Primaten sind jedenfalls a) mit der Ingression bzw. epithelio-mesenchymalen Transition am länglichen Primitivstreifen, und b) der Involution am kanalartigen neurenterischen Kanal zwei Formen der Gastrulation in einem Organismus nachweisbar. Neben klassischen Modellorganismen wie Maus und Huhn zur Erforschung des Primitivstreifens bieten daher auch Reptilen eine Chance, die menschliche Embryogenese besser zu verstehen. Einige Vertreter der Reptilien sind bereits im neunzehnten und zwanzigsten Jahrhundert in Einzelpublikationen deskriptiv erfasst worden (Bertocchini et al. (2013) und Arias et al. (2017) und vergleiche Verweise hierin). Dennoch ist es - anders als bei allen anderen Landwirbeltieren - bisher nicht gelungen ein akzeptiertes Reptilienmodell in der Entwicklungsbiologie zu etablieren. Insofern fehlen Reptilien auch noch oft in den gängigen Lehrbüchern (vgl. Gilbert und Barresi 2016).

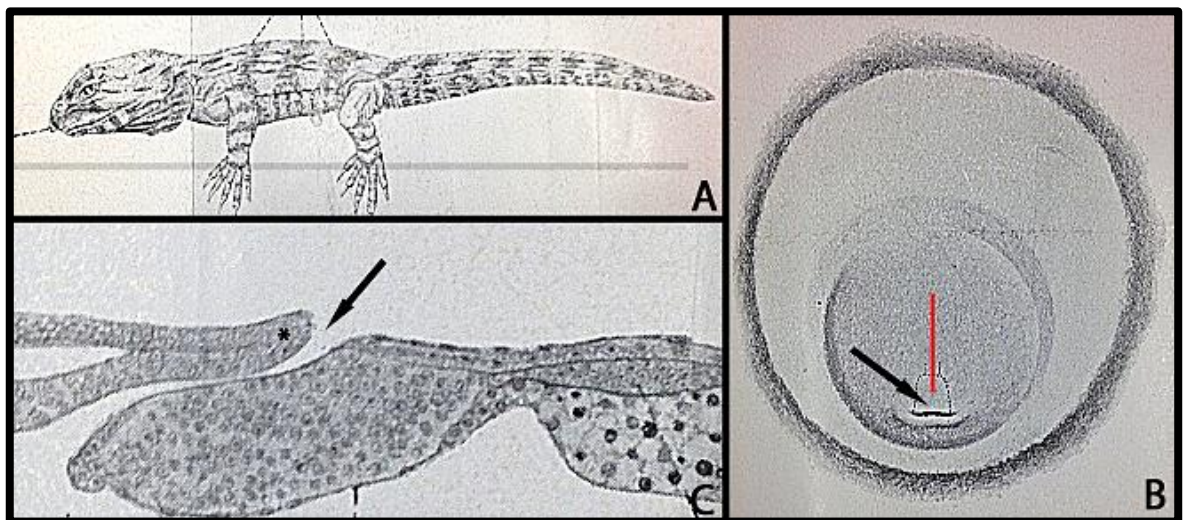


Abbildung 7 **Ähnlichkeit des Blastoporus der Brückenechse (*Sphenodon punctatus*; entnommen aus Schauinsland (1899)) mit dem neurenterischen Kanal der Primaten.** (A) Gezeichnete Brückenechsenembryo kurz vor dem Schlüpfen. (B) Dorsale Aufsicht auf eine Keimscheibe. Der schwarze Pfeil markiert die dorsale Öffnung des Blastoporus. Der rote Strich markiert die Schnittrichtung von (C). (C) Medianer Schnitt durch die Keimscheibe mit sichtbarem Umbördelungspunkt zwischen Neuroektoderm und Chordaplatte (markiert durch \*) und dorsalem Eingang zu einem longitudinalen Kanal (markiert durch den schwarzen Pfeil). Es sind frappierende morphologische und funktionelle Ähnlichkeiten zu den in Abbildung 4 gezeigten Embryonen zu erkennen.

#### 4.4 Die frühe Etablierung der Links-/Rechtsasymmetrie beim Menschen und anderen Primaten

Die frühe asymmetrische *Nodal*-Expression im Embryo GM79.01, die in allen Embryonen beobachteten morphologischen Asymmetrien und die Nachweisbarkeit eines SCM in den Embryonen des Stadiums 8a weisen darauf hin, dass bei Primaten die primäre Etablierung der

Links-/Rechtsachse nicht von Zilien abhängig ist. Dies ist ähnlich zu der Situation bei Schweinen und Rindern (Schröder et al. 2016). Ein potenziell Zilien tragender ventraler Primitivknoten, dem experimentell nachweisbar in der Maus eine zentrale Rolle für einen möglichen linksgerichteten extrazellulären Fluss zukommt (Yoshida und Hamada 2014; Shinohara und Hamada 2017), ist hier noch komplett von dem SCM bedeckt. Der ventrale Primitivknoten ist somit in diesem Stadium einem extrazellulären Fluss unzugänglich. Wahrscheinlich kommt den motilen Zilien beim Menschen und *Callithrix* erst in der späteren Fortentwicklung der Asymmetrie eine Bedeutung zu.

## 4.5 Ausblick und Perspektiven

Um kleine SOIs wie den neurenterischen Kanal noch genauer erfassen zu können, ist für die bereits als histologische Präparate vorliegenden Embryonen eine Untersuchung mit einem Mikro-CT denkbar. Die Auflösung dieser computertomographischen Untersuchung liegt hierbei im Submillimeterbereich (zeiss.com, x-ray-microscopy), ist also einer konventionellen lichtmikroskopischen Betrachtung sogar überlegen. Allerdings sind sowohl der Kauf der entsprechenden Geräte, als auch nur die Inanspruchnahme der Dienstleistung teuer und mit logistischem Aufwand verbunden. Um funktionelle Zusammenhänge bei der Chordaentwicklung am HINC genauer zu verstehen sind weitere In-situ-Hybridisierungen mit bereits bekannten Genen der Chordaenstehung (Weinstein et al. 1994; Talbot et al. 1995) an sagittal geschnittenen Embryonen der Stadien 8a und 8b interessant. Ebenso birgt die Etablierung eines Reptilienmodells eine große Chance für die Entwicklungsbiologie, in dem fundamentalen Bereich der Gastrulation neue Erkenntnisse zu gewinnen. Um embryologische Forschung an frühen und seltenen menschlichen Embryonen für eine möglichst große wissenschaftliche Gemeinschaft möglich zu machen und mit Daten zu unterfüttern, wird Initiativen wie dem "Digital Embryology Consortium" (human-embryology.org, Main\_Page) eine weiter wachsende Wichtigkeit zukommen (siehe Kameda et al. 2012). Diese widmen sich a) der Digitalisierung und dem Zur-Verfügung-Stellen von embryologischen Sammlungen und b) Metadaten zu diesen Sammlungen. Auch die Anatomie Göttingen ist an diesem Projekt beteiligt. Weiterhin ist die Fortführung der Kooperation mit dem Deutschen Primatenzentrum wünschenswert.

Die Arbeit an alten Fragestellungen wird dank der zunehmenden Digitalisierung durch einfacheren Zugang zu Embryonen erleichtert. Profunde mikroskopisch morphologische Vorarbeit durch einen Embryologen legt mit gut begründeten Definitionen den belastbaren Grundstein, um schwer zugängliche und lange strittige Strukturen der ersten Wochen der Embryogenese mittels intuitiver Modelle einem breiten Publikum zugänglich zu machen.

Hierdurch kann ein Beitrag zum Grundverständnis der Entwicklung des Lebens mit seinen Normvarianten und Pathologien geleistet werden. Hieraus wiederum mögen in Zukunft Ideen zu Diagnostik und Therapie von Erkrankungen wachsen.

## 5 Zusammenfassung

Über die Existenz des neurenterischen Kanals und seinen potentiellen Einfluss auf fetale Malformationen wie neuroendodermale Zysten, *junctional neurulation defects* und dem *split notochord syndrome* diskutieren Embryologen und klinisch tätige Ärzte seit mehr als hundert Jahren. Durch die Seltenheit von menschlichen Embryonen der fraglichen Entwicklungszeit von neunzehn bis einundzwanzig Entwicklungstagen (Carnegie-Stadien 8 und 9) und ihre weltweite Verteilung war eine fundierte vergleichende Untersuchung stets erschwert. Der in dieser Arbeit erfolgte, systematische und kleinschrittige Vergleich der Histologie von fünf menschlichen und zwei Weißbüschelaffenembryonen der Stadien 8 und 9 sowie deren partielle virtuelle Rekonstruktion ermöglichen erstmals die Beschreibung des neurenterischen Kanals als physiologische Struktur der Embryogenese von Primaten. Als senkrechter Kanal im Bereich des Primitivknotens verbindet er Amnionhöhle mit Dottersack und ermöglicht eine hufeisenförmige Involution des Ektoderms. Hierdurch entsteht die Chordaplatte, die wiederum die Neurulation induziert. Darüber hinaus wiesen die asymmetrische Expression des Gens *Nodal* im paraaxialen Mesoderm eines Embryos und morphologische Asymmetrien in sechs von sieben untersuchten Embryonen auf eine frühe, wahrscheinlich von Zilien unabhängige Etablierung der Links-/Rechtskörperachse bei Primaten hin. Daraus lässt sich schließen, dass der neurenterische Kanal der Primaten eine funktionelle und morphologische Homologie des in Amphibien, Reptilien und einigen Vögeln beschriebenen Blastoporus darstellt. Damit wären bei Primaten zwei bisher nur separat betrachtete Prozesse der Gastrulation, die Involution an einem Kanal und die Ingression entlang einer Achse, in einem Organismus nachweisbar. Der Prozess der Gastrulation, also die Anlage der drei Keimscheibenblätter, wäre damit komplexer als bisher angenommen. Die räumlichen Zusammenhänge dieser schwierig zu verstehenden, mikroskopisch kleinen Strukturen konnten dabei durch die Anwendung von nachvollziehbaren Methoden der digitalen Rekonstruktion und des anschließenden dreidimensionalen Drucks „begreifbar“ dargestellt werden. Gerade für die Ausbildung von Studenten und jungen Ärzten bietet sich hierdurch die Chance, klassische embryologische Lehre durch neue, interaktive Konzepte zu unterstützen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aeckerle N, Drummer C, Debowski K, Viebahn C, Behr R (2015): Primordial germ cell development in the marmoset monkey as revealed by pluripotency factor expression: suggestion of a novel model of embryonic germ cell translocation. *Mol Hum Reprod* 21, 66–80.
- Arendt D, Nübler-Jung K (1999): Rearranging gastrulation in the name of yolk: Evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. *Mech Dev* 81, 3–22
- Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C (2010): 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech* 73, 1019–1029
- Arias CF, Herrero MA, Stern CD, Bertocchini F (2017): A molecular mechanism of symmetry breaking in the early chick embryo. *Sci Rep* 7, 15776
- Aversi-Ferreira TA, Aversi-Ferreira R, Nascimento GNL do, Nyamdavaa N, Araujo MF, Ribeiro PP, Da Silva NC, Brandão LD, Gratão LHA, Abreu T de (2012): Teaching embryology using models construction in practical classes. *Int J Morphol* 30, 188–195
- Bancroft JD, Layton C, Bancroft JD: The hematoxylin and eosin, connective and mesenchymal tissues with their stains. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (Hrsg.): *Bancroft's Theory and practice of histological techniques*. 7. Auflage; Churchill Livingstone Elsevier, Oxford 2013, 173–212
- Beck CW, Slack JMW (1998): Analysis of the developing *Xenopus* tail bud reveals separate phases of gene expression during determination and outgrowth. *Mech Dev* 72, 41–52
- Bentley JFR, Smith JR (1960): Developmental Posterior Enteric Remnants and Spinal Malformations: The Split Notochord Syndrome: Developmental Posterior Enteric Remnants and Spinal Malformations: The Split Notochord Syndrome. *Arch Dis Child* 35, 76–86
- Bertocchini F, Alev C, Nakaya Y, Sheng G (2013): A little winning streak: The reptilian-eye view of gastrulation in birds. *Dev Growth Differ* 55, 52–59
- Blum M, Andre P, Muders K, Schweickert A, Fischer A, Bitzer E, Bogusch S, Beyer T, van Straaten H W M, Viebahn C (2007): Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochordal plate in the mammalian embryo. *Differentiation* 75, 133–146
- Blum M, Feistel K, Thumberger T, Schweickert A (2014): The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* 141, 1603–1613
- Born G (1883): Die Plattenmodelliermethode. *Arch Mikr Anat* 22, 584–599
- Boroviak T, Loos R, Lombard P, Okahara J, Behr R, Sasaki E, Nichols J, Smith A, Bertone P (2015): Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell* 35, 366–382
- Cambray N, Wilson V (2002): Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Dev Camb Engl* 129, 4855–4866
- Carlson BM (2002): Embryology in the medical curriculum. *Anat Rec* 269, 89–98
- Dady A, Havis E, Escriou V, Catala M, Duband J-L (2014): Junctional neurulation: A unique developmental program shaping a discrete region of the spinal cord highly susceptible to neural tube defects. *J Neurosci* 34, 13208–13221

- de Bakker BS, de Jong KH, Hagoort J, de Bree K, Besselink CT, de Kanter FEC, Veldhuis T, Bais B, Schildmeijer R, Ruijter JM, et al. (2016): An interactive three-dimensional digital atlas and quantitative database of human development. *Science* 354, aag0053-1 - aag0053-8
- Debowski K, Drummer C, Lentjes J, Cors M, Dressel R, Lingner T, Salinas-Riester G, Fuchs S, Sasaki E, Behr R (2016): The transcriptomes of novel marmoset monkey embryonic stem cell lines reflect distinct genomic features. *Sci Rep* 6, 29122
- Dhawan V, Kapoor K, Singh B, Kochhar S, Sehgal A, Dada R (2017): Split Notochord Syndrome: A Rare Variant. *J Pediatr Neurosci* 12, 177–179
- Eibach S, Moes G, Hou YJ, Zovickian J, Pang D (2017): Unjoined primary and secondary neural tubes: Junctional neural tube defect, a new form of spinal dysraphism caused by disturbance of junctional neurulation. *Childs Nerv Syst* 33, 1633–1647
- Emura T, Asashima M, Hashizume K (2000): An Experimental Animal Model of Split Cord Malformation. *Pediatr Neurosurg* 33, 283-293
- Emura T, Hashizume K, Asashima M (2003): Experimental study of the embryogenesis of gastrointestinal duplication and enteric cyst. *Ped Surgery Int* 19, 147-151
- Eternod ACF (1899): Il ya un canal notochordal dans l'embryon humain. *Anat Anz* 16, 131-143
- Florea SM, Faure A, Brunel H, Girard N, Scavarda D (2018): A case of junctional neural tube defect associated with a lipoma of the filum terminale: A new subtype of junctional neural tube defect? *J Neurosurg Pediatr* 34, 1447–1448
- Gihl M (1961): Methode zur Rekonstruktion von Nervenzellen. *J Hirnforsch* 5, 7–22
- Gilbert S (2003): The Morphogenesis Of Evolutionary Developmental Biology. *Int J Dev Biol* 47, 467–477
- Gilbert SF, Barresi MJF: *Developmental biology*. 11. Auflage; Sinauer Associates Inc, Sunderland, 2016
- Gont LK, Steinbeisser H, Blumberg B, de Robertis EM (1993): Tail formation as a continuation of gastrulation: The multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119, 991–1004
- Greenough TC, Carville A, Coderre J, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Mansfield K (2005): Pneumonitis and Multi-Organ System Disease in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) Infected with the Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus. *Am J Pathol* 167, 455–463
- Grosser O (1924): Junge menschliche Embryonen (der dritten und vierten Woche). *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 25, 390–447
- Gupta DK, Deodhar MC (1987): Split notochord syndrome presenting with meningocele and dorsal enteric fistula. *J Pediatr Surg* 22, 382–383
- Haeckel E (1874): Die gastraea-theorie, die phylogenetische classification des tierreichs und die homologie der keimblätter. *Jena Z Naturw* 8, 1–55
- Hendrickx AG: *Embryology of the Baboon*. University of Chicago Press, Chicago 1971
- Hertig AT: *Human trophoblast*. CC Thomas, Springfield 1968

- Hertig AT, Gore H: Female Genitalia: Placenta Amnion and Umbilical Cord. In: Anderson WAD (Hrsg.): Pathology. Band 25; 5. Auflage; C.V. Mosby Company, Saint Louis 1966, 1186-1189
- Heuser CH (1932): A presomite human embryo with a definite chorda canal. *Contrib Embryol* 23, 251–267
- Heuser CH, Streeter GL (1941): Development of the macaque embryo. *Contrib Embryol* 29, 15-55
- Hill JP, Florian J (1931): A Young Human Embryo (Embryo Dobbin) with Head-Process and Prochordal Plate. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 219, 443–486
- Hoffmann CK (1883): Zur Ontogenie der Knochenfische. *Arch Mikr Anat* 23, 45–108
- Holschneider AM, Fendel H (1971): Beitrag zu Wirbelsäulenfehlbildungen in Kombination mit intestinalen und urogenitalen Missbildungen. *Z Kinderchir Grenzgeb* 10, 230-238
- Holschneider AM, Fendel H (1972): Zur Problematik des persistierenden Canalis neurentericus: Bemerkungen zu der Arbeit von Springer. *Z Kinderchir* 11, 190–194
- Hueston JT (1953): The aetiology of pilonidal sinuses. *Br J Surg* 41, 307–311
- Kallet HI (1940): Pilonidal sinus. *Am J Surg* 50, 648–652
- Kameda T, Yamada S, Uwabe C, Suganuma N (2012): Digitization of clinical and epidemiological data from the Kyoto Collection of Human Embryos: Maternal risk factors and embryonic malformations. *Congenit Anom* 52, 48–54
- Kanat BH, Sözen S (2015): Disease that should be remembered: Sacrococcygeal pilonidal sinus disease and short history. *World J Clin Cases* 3, 876–879
- Katorza E, Gat I, Duvdevani N, Meller N, Pardo N, Barzilay E, Achiron R (2018): Fetal brain anomalies detection during the first trimester: expanding the scope of antenatal sonography. *J Matern Fetal Neonatal Med* 31, 506–512
- Khurana A, Burt A, Beck G, Anton T, Perez M, Levy D, Pretorius D (2017): Fetal Cardiac Screening Sonography: Methodology: Women's Imaging. *RadioGraphics* 37, 360–361
- Kowalevsky A (1871): Weitere Studien über die Entwicklung der einfachen Ascidien. *Arch Mikr Anat* 7, 101–130
- Kowalevsky A (1877): Weitere Studien über die Entwicklungsgeschichte des *Amphioxus lanceolatus*, nebst einem Beitrage zur Homologie des Nervensystems der Würmer und Wirbelthiere. *Arch Mikr Anat* 13, 181–204
- Leibovitch E, Wohler JE, Cummings Macri SM, Motanic K, Harberts E, Gaitán MI, Maggi P, Ellis M, Westmoreland S, Silva A, et al. (2013): Novel marmoset (*Callithrix jacchus*) model of human Herpesvirus 6A and 6B infections: Immunologic, virologic and radiologic characterization. *PLoS Pathog* 9, 1-12
- Lieberkühn N: Über die Chorda bei Säugethieren. In: His W, Braune W (Hrsg.): *Archiv für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 1. Auflage; Veit & Comp, Leipzig 1882, 399–438
- Ludwig E (1928): Über einen operativ gewonnen menschlichen Embryo mit einem Ursegemente. *Gegenbauers Morphol Jahrb* 59, 41–103
- Männer J (2001): Does an equivalent of the ventral node exist in chick embryos? A scanning electron microscopic study. *Z Anat Entwicklungsgesch* 203, 481–490



- Mittal S, Petrecca K, Sabbagh AJ, Rayes M, Melançon D, Guiot M-C, Olivier A (2010): Supratentorial neurenteric cysts-A fascinating entity of uncertain embryopathogenesis. *Clin Neurol Neurosurg* 112, 89–97
- Neuhauser EBD, Kaufmann HJ (1961): AO Kovalevski and the neurenteric canal: A note on some historical inaccuracies. *Proc R Soc Med* 54, 927–929
- Oakeshott P, Reid F, Poulton A, Markus H, Whitaker RH, Hunt GM (2015): Neurological level at birth predicts survival to the mid-40s and urological deaths in open spina bifida: a complete prospective cohort study. *Dev Med Child Neurol* 57, 634–638
- Odgers PNB (1941): A presomite human embryo with a neurenteric canal (embryo R.S.). *J Anat* 75, 381–388.3
- O’Rahilly R, Müller F (1981): The first appearance of the human nervous system at stage 8. *Z Für Anat Entwicklungsgesch* 163, 1–13
- O’Rahilly R, Müller F: *Development stages in human embryos*, 1. Auflage; Carnegie Institution of Washington, Washington D.C. 1987
- O’Rahilly R, Müller F: *The embryonic human brain: An atlas of developmental stages*, 3. Auflage; John Wiley & Sons, Hoboken 2006
- Pasteels J (1943): Proliférations et croissance dans la gastrulation et la formation de la queue des Vertébrés. *Arch Biol* 54, 1–51
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM: *Neuroscience, the Initial Formation of the Nervous System: Gastrulation and Neurulation*, 2. Auflage; Sinauer Associates, Sunderland 2001
- Püschel B, Jouneau A (2015): Whole-mount in situ hybridization to assess advancement of development and embryo morphology. *Methods Mol Biol* 1222, 255–265
- Rossenbeck H (1923): Ein junges menschliches Ei. Ovum humanum Peh. 1—Hochstetter. *Z Für Anat Entwicklungsgesch* 68, 325–385
- Rulle A, Tsikolia N, de Bakker B, Drummer C, Behr R, Viebahn C (2018): On the Enigma of the Human Neurenteric Canal. *Cells Tissues Organs* 205, 256–278
- Samassa P (1898): Studien über den Einfluss des Dotters auf die Gastrulation und die Bildung der primären Keimblätter der Wirbelthiere. *Dev Genes Evol* 7, 1–33
- Sander I: *Beschreibung eines menschlichen Embryos der dritten Woche*: Med. Diss. Göttingen 2002
- Santos de Oliveira R, Cinalli G, Roujeau T, Sainte-Rose C, Pierre-Kahn A, Zerah M (2005): Neurenteric cysts in children: 16 consecutive cases and review of the literature. *J Neurosurg Pediatr* 103, 512–523
- Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, et al. (2005): Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 23, 1304–1313
- Schauinsland H (1899): Beiträge zur Biologie und Entwicklung der Hatteria nebst Bemerkungen über die Entwicklung der Sauropsiden. *Anat Anz* 15, 309–334
- Schauinsland H: *Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Wirbeltiere*. E. Nägels, Stuttgart 1903

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682
- Schmidt C, Voin V, Iwanaga J, Alonso F, Oskouian RJ, Topale N, Tubbs RS, Oakes WJ (2017): Junctional neural tube defect in a newborn: Report of a fourth case. *Childs Nerv Syst* 33, 873–875
- Schröder SS, Tsikolia N, Weizbauer A, Hue I, Viebahn C (2016): Paraxial Nodal Expression Reveals a Novel Conserved Structure of the Left-Right Organizer in Four Mammalian Species. *Cells Tissues Organs* 201, 77–87
- Selenka E: Studien über Entwicklungsgeschichte der Tiere. CW Kreidel, Wiesbaden 1900
- Sharma A, Monson J: Total Mesorectal Excision. In: Chang GJ (Hrsg.): Rectal Cancer, 1. Auflage; Springer, Basel 2018, 109–121
- Shinohara K, Hamada H (2017): Cilia in Left–Right Symmetry Breaking. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, 1-11
- Shook DR, Keller R (2008): Epithelial type, ingression, blastopore architecture and the evolution of chordate mesoderm morphogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 310, 85–110
- Singh A, Singh R (1982): Split notochord syndrome with dorsal enteric fistula. *J Pediatr Surg* 17, 412–413
- Sobotta J (1911): Die Entwicklung des Eies der Maus vom ersten Auftreten des Mesoderms an bis zur Ausbildung der Embryonalanlage und dem Auftreten der Allantois. *Arch Mikr Anat* 78, 271–352
- Springer M (1972): Der Canalis neurentericus beim Menschen. *Z Für Kinderchir* 11 (1), 183–189
- Sternberg H (1927): Beschreibung eines menschlichen Embryos mit vier Ursegmentpaaren. *Z Anat Entwicklungsgesch* 82, 142–240
- Strahl H (1916): Über einen jungen menschlichen Embryo nebst Bemerkungen zu C. Rabls Gastrulationstheorie *Anat Hefte* 54, 115–146
- Talbot WS, Trevarrow B, Halpern ME, Melby AE, Farr G, Postlethwait JH, Jowett T, Kimmel CB, Kimelman D (1995): A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378, 150–157
- Tamarin A (1983): Stage 9 macaque embryos studied by scanning electron microscopy. *J Anat* 137, 765
- Tsikolia N, Schröder S, Schwartz P, Viebahn C (2012): Paraxial left-sided nodal expression and the start of left-right patterning in the early chick embryo. *Differ Res Biol Divers* 84, 380–391
- Ventola CL (2014): Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *Pharm Ther* 39, 704–711
- von Beneden ED: Untersuchungen über die Blätterbildung, den Chordokanal und die Gastrulation bei den Säugetieren, Kaninchen und *Vespertilio murinus*. In: Bardeleben K (Hrsg.): Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Anatomischer Anzeiger. Band 3; 1. Auflage; Gustav Fischer, Jena 1888, 709-714
- von Spee F (1889): Beobachtungen an einer menschlichen Keimscheibe mit offener Medullarrinne und Canalis neurentericus. In: His W, Braune W (Hrsg.): Archiv für Anatomie und Entwicklungsgeschichte. 1. Auflage; Veit & Comp, Leipzig 1889, 159–176

- Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE (1994): The winged-helix transcription factor HNF-3 $\beta$  is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**, 575–588
- Wilson JT (1914): Observations upon Young Human Embryos. *J Anat Physiol* **48**, 315–351
- Wojtyła S, Klama P, Baran T (2017): Is 3D printing safe? Analysis of the thermal treatment of thermoplastics: ABS, PLA, PET, and nylon. *J Occup Environ Hyg* **14** (6), D80–D85
- Yang T, Wu L, Fang J, Yang C, Deng X, Xu Y (2015): Clinical presentation and surgical outcomes of intramedullary neurenteric cysts. *J Neurosurg Spine* **23**, 99–110
- Yoshida S, Hamada H (2014): Roles of cilia, fluid flow, and Ca<sup>2+</sup> signaling in breaking of left–right symmetry. *Trends Genet* **30**, 10–17
- Zaletel I, Marić G, Gazibara T, Rakočević J, Labudović Borović M, Puškaš N, Bajčetić M (2016): Relevance and attitudes toward histology and embryology course through the eyes of freshmen and senior medical students: Experience from Serbia. *Ann Anat* **208**, 217–221

## 6.1 Internetquellen

<http://3datlas.3dembryo.nl/>; Zugriff am 01.06.2019

[http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/downloads/DREM\\_disks.html](http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/downloads/DREM_disks.html); Zugriff am 01.09.2019

[http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/demos/Stage8\\_v2/Intro\\_pg/Intro.htm](http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/demos/Stage8_v2/Intro_pg/Intro.htm); Zugriff am 01.09.2019

[http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/demos/Stage8\\_v2/Brws\\_pg/Disp\\_FS.htm](http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/demos/Stage8_v2/Brws_pg/Disp_FS.htm); Zugriff am 01.09.2019

[https://human-embryology.org/wiki/Main\\_Page](https://human-embryology.org/wiki/Main_Page); Zugriff am 01.06.2019

<https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/x-ray-microscopy.html>; Zugriff am 01.09.2019

## 7 Anhang

Teile dieser Arbeit sind durch den Autor veröffentlicht worden: **Rulle A**, Tsikolia N, de Bakker B, Drummer C, Behr R, Viebahn C (2018): On the Enigma of the Human Neurenteric Canal. *Cells Tissues Organs* 205, 256–278. DOI 10.1159/000493276.

<https://www.karger.com/Article/FullText/493276>.

Ebenso wurden Teile der Ergebnisse auf dem Alpenländischen Anatomentreffen 2018 in Obergurgl und der Versammlung der Anatomischen Gesellschaft 2018 in Rostock im Rahmen von Vorträgen vorgestellt.

Die dieser Dissertationsschrift zu Grunde liegende Publikation darf mit freundlicher Genehmigung der S. KARGER AG anbei abgedruckt und veröffentlicht werden.

## On the Enigma of the Human Neurenteric Canal

Alexander Rulle<sup>a</sup> Nikoloz Tsikolia<sup>a</sup> Bernadette de Bakker<sup>b</sup> Charis Drummer<sup>c</sup>  
Rüdiger Behr<sup>c, d</sup> Christoph Viebahn<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Anatomy and Embryology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany; <sup>b</sup>Department of Medical Biology, Section Clinical Anatomy & Embryology, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; <sup>c</sup>Platform Degenerative Diseases, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany; <sup>d</sup>University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany

### Keywords

Blastopore · Human embryology · Junctional neurulation defects · Mammalian left-right differentiation · Neurulation · Notochord · Notochordal canal · Primate model organisms · Split notochord syndrome · Three-dimensional reconstruction

### Abstract

Existence and biomedical relevance of the neurenteric canal, a transient midline structure during early neurulation in the human embryo, have been controversially discussed for more than a century by embryologists and clinicians alike. In this study, the authors address the long-standing enigma by high-resolution histology and three-dimensional reconstruction using new and historic histological sections of 5 human 17- to 21-day-old embryos and of 2 marmoset monkey embryos of the species *Callithrix jacchus* at corresponding stages. The neurenteric canal presents itself as the classical vertical connection between the amniotic cavity and the yolk sac cavity and is lined (a) cranio-laterally by a horse-shoe-shaped “hinge of involuting notochordal cells” within Hensen’s node and (b) caudally by the receding primitive streak epiblast dorsally and by notochordal plate epithelium ventrally, the latter of which covered the (longitudinal) no-

tochordal canal on its ventral side at the preceding stage. Furthermore, asymmetric parachordal *nodal* expression in *Callithrix* and morphological asymmetries within the nodes of the other specimens suggest an early non-cilium-dependent left-right symmetry breaking mode previously postulated for other mammals. We conclude that structure and position of the mammalian neurenteric canal support the notion of its homology with the reptilian blastopore as a whole and with a dorsal segment of the blastopore in amphibia. These new features of the neurenteric canal may further clarify the aetiology of foetal malformations such as junctional neurulation defects, neuroendodermal cysts, and the split notochord syndrome.

© 2018 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Gastrulation is the life-shaping process of germ layer formation in the animal kingdom, its name being derived from the image of a “mini-stomach” transiently formed by the blastula (or blastocyst) stage embryo [Haeckel,

This paper is dedicated to the late Ronan O’Rahilly, who died in Fri-bourg, Switzerland, June 24, 2018, at the age of 96.

**KARGER**

© 2018 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/cto

Christoph Viebahn  
Institute of Anatomy and Embryology  
Kreuzbergstr. 36  
DE-37075 Göttingen (Germany)  
E-Mail christoph.viebahn@medizin.uni-goettingen.de

1874]. Germ layers are formed by cellular involution and delamination of the (outer layer) epiblast cells at the lips of a canal-like blastopore in amphibians and in reptiles (i.e., in non-avian or non-mammalian amniotes) such as turtles, lizards, and tuatara, the latter being thought to represent a common ancestor; alternatively, germ layers in mammals including *Homo sapiens* and birds are formed by cellular ingression and epithelial-mesenchymal transition at the primitive streak (with its anterior-posterior axis-defining furrow in the epiblast). Blastopore and primitive streak have, therefore, repeatedly presented to be functional equivalents derived from a common ancestor and thus to be homologous structures [Arendt and Nübler-Jung, 1999]. A recent focus on reptiles, however, led to the proposal that the avian and the human primitive streak may have developed independently and that reptiles with their narrow canal-like blastopore, which runs more or less perpendicularly through the embryonic plate connecting the amniotic cavity with the yolk sac cavity [Bertocchini et al., 2013], may have an “intermediate blastopore” or “proto-streak” with crucial importance for gastrulation [Stower and Bertocchini, 2017].

Early morphological studies of Kowalevsky in 1869 [Kowalevsky, 1877; Neuhauser and Kaufmann, 1961] on the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) described a morphological structure similar to the reptilian and amphibian blastopore which penetrates perpendicularly all germinal layers and is closely related in terms of developmental time and localization to the emergence of the chorda dorsalis, the class-defining axial structure in the animal kingdom. Later, this transient blastopore-like structure was called the neurenteric canal and indeed assumed to be a homologue of the blastopore [Hoffmann, 1883] on account of the morphological similarity. Subsequently, the neurenteric canal was also observed during development of mammals such as *Vespertilio murinus* (the parti-coloured bat) immediately cranial to the primitive streak but caudal to the primitive (or Hensen’s) node [van Beneden, 1888]. In human embryos, the neurenteric canal was described first by von Spee [1889] but considered by some as a post-mortem artefact [Sternberg, 1927] while other publications stated its appearance to be physiological [Odgers, 1941; O’Rahilly and Müller, 1981]. In fact, the controversy about the existence of the neurenteric canal during human development has never ceased, even when enforced by clinicians speculating about its role in foetal malformations [Holschneider and Fendel, 1971]. Human embryos of the stages in question (Carnegie stages 8 and 9; on average at 17–21 days of development) are rare, mostly dating back to the last century, and distributed worldwide in

many embryological collections. However, embryologists always agreed on the definition of another transient canal-like structure with a dorsal opening to the amniotic cavity but appearing at slightly earlier stages: the notochordal canal or chorda canal [Grosser, 1924], which had been found first in the hedgehog and the guinea pig [Lieberkühn, 1882] and later also in a human embryo by Eternod [1899]. The notochordal canal is a longitudinal canal between the (epithelial cells of the) developing notochordal plate dorsally and mesenchymal cells of the axial mesoderm ventrally [van Beneden, 1888; Sternberg, 1927; Heuser, 1932]. This ventral stretch of the axial mesoderm was recently found also in the chick (where a typical notochordal canal has not been described so far) and was coined subchordal mesoderm (SCM) in contradistinction to the notochordal plate lying dorsal to it [Tsikolia et al., 2012]; its presence was soon confirmed in several mammalian species such as rabbit, pig, and cattle, and furthermore shown to be topographically related to an early non-cilium-dependent molecular left-right asymmetry [Schröder et al., 2016]. During further development in mammals, the notochordal canal loses its ventral wall as the SCM disintegrates through an as yet unknown mechanism with the effect that the notochordal plate has direct contact to the yolk sac cavity [Heuser, 1932]. Intriguingly, the process of SCM disintegration is suited to give rise to a dorsoventrally oriented canal remnant, which connects the amniotic cavity with the yolk sac cavity, may persist until early somite stages, and, therefore, fits the criteria of the neurenteric canal mentioned above [O’Rahilly and Müller, 1987]. However, the most recent descriptions in the human embryo, which took advantage of the few well-preserved specimens with signs of a neurenteric canal, only [Müller and O’Rahilly, 2003, 2004], still left some room for interpretation as to the terminology and definition for both the notochordal or a neurenteric canal in the human embryo.

Inspired by observations on (1) an unpublished human stage 8 embryo with excellent tissue preservation in the collection of the Center of Anatomy at the University of Göttingen and (2) two (stage 8 and 9) embryos of *Callithrix jacchus* (the common marmoset monkey), the authors address the enigma of the neurenteric canal anew, this time also including previous suggestions about the homology of its neighbouring structures in human and non-human primate embryos: On the basis of a clear definition of the cellular composition in the walls of the notochordal canal and the neurenteric canal during gastrulation of non-human primates and with reference to the “charnière de réflexion” [Pasteels, 1943] – later renamed

**Table 1.** Embryos investigated in this study

Species	Specimen No./name	Year of publication	Location	Carnegie stage	Fix.	Emb.	Sect. plane	Sect. thickn., $\mu\text{m}$	Stain	3DR
Human	93.2.2	2001 <sup>1</sup>	CAG	8a	B	P	sag.	10	H&E	24 sect. 4 sect. <sup>10</sup>
Human	CC8671	1949 <sup>2</sup>	CCW <sup>7</sup>	8a	A&B	C&P	sag.	6	H&E	30 sect. 6 sect. <sup>10</sup>
Human	Dobbin	1931 <sup>3</sup>	NB	8b	Al	C&P	tr.	8	unknown	55 sect.
Human	CC10157	1967 <sup>4</sup>	CCW <sup>8</sup>	8b	F	P	to	5–8	C	39 sect. 16 sect. <sup>10</sup>
Human	Da1	1928 <sup>5</sup>	unknown	9	B	P	tr.	8	A	6 sect.
<i>Callithrix jacchus</i>	GM79.01	2018 <sup>6</sup>	CAG <sup>9</sup>	8b	B	Te	tr.	5	H&E	65 sect.
<i>Callithrix jacchus</i>	GP09.01	2018 <sup>6</sup>	CAG	9	B	P	tr.	7	H&E	34 sect.

3DR, three-dimensional reconstruction; B, Bouin; F, formaldehyde; A&B, alcohol and Bouin; Al, alcohol; P, paraffin; C&P, cedar-wood oil-pyroxelene and paraffin; Te, Technovit; H&E, haematoxylin and eosin; C, Cason; A, Alaun-Cochennille; CAG, Center of Anatomy Göttingen; CCW, Carnegie Collection at Washington DC; NB, Naturkundemuseum Berlin; sag., sagittal; to, transverse oblique; tr, transverse.

<sup>1</sup> Sander [2001]. <sup>2</sup> Hertig and Gore [1966], O’Rahilly and Müller [2006] and de Bakker et al. [2016]. <sup>3</sup> Hill and Florian [1931]. <sup>4</sup> O’Rahilly and Müller [1987]. <sup>5</sup> Ludwig [1928]. <sup>6</sup> This study. <sup>7</sup> Sections available for download at <http://3datlas.3dembryo.nl/>. <sup>8</sup> Cork and Gasser [2017a]; sections available at [http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/downloads/DREM\\_disks.html](http://virtualhumanembryo.lsuhs.edu/downloads/DREM_disks.html). <sup>9</sup> Analyzed by whole-mount in situ hybridization prior to histological sectioning. <sup>10</sup> Number of sections used for “wide” reconstruction mode (see Materials and Methods).

“chordoneural hinge” [Gont et al., 1993; Beck and Slack, 1998; Cambrey and Wilson, 2002] – the histology of suitable human specimens previously published is re-interpreted and subjected to high-resolution three-dimensional reconstruction (3DR). As the results were also obtained in *C. jacchus*, which serves as a timely primate model organism from stem cell research [Thomson et al., 1996; Sasaki et al., 2005; Boroviak et al., 2015; Debowski et al., 2016] to virology [Greenough et al., 2005; Leibovitch et al., 2013], the data presented here may be translated to other non-human primates [Selenka, 1900; Heuser and Streeter, 1941; Hendrickx, 1971] and may in this larger context then further clarify, on the one hand, the mechanisms of human gastrulation and neurulation, and, on the other hand, the evolution of generating the amniote body plan.

### Materials and Methods

The embryos studied in this publication are listed in Table 1 according to species and their classification in Carnegie stages. The 2 marmoset embryos of the species *C. jacchus* and the human specimen with the designation 93.2.2 belong to the collection of the Center of Anatomy in Göttingen (Germany). The other 4 human

embryos were analyzed on the basis of published data as indicated. Using the length of the notochordal plate as an established marker for the definition of stage 8 embryos, subdivisions between stage 8a (notochordal plate ventrally covered by SCM) and stage 8b (notochordal plate with direct contact to yolk sac cavity) were defined for a more precise classification.

#### Human Embryos

Embryo 93.2.2 had been accidentally found at a medically indicated abrasio uteri in the year 1993, immersed in Bouin solution for several weeks starting 30 min after the operation, photographed in Locke solution, embedded in paraffin, serially sectioned sagittally at 10  $\mu\text{m}$ , and stained with haematoxylin and eosin. The first histological description of the embryo was part of the medical dissertation by Sander [2001] who reconstructed the embryo using the projection method established by Gühr [1961]. The menstrual history of the mother, and thus the estimated development time, is unknown, but the embryo was categorized on morphological grounds as a Carnegie stage 8a embryo. The collection and use of this embryo in the present study was approved by the Ethics Committee of the University Medical Center Göttingen under reference No. 28/2/18An.

The human embryos CC8671 (stage 8a) [Hertig and Gore, 1966] and CC10157 (stage 8b) belong to the Carnegie Collection in Washington D.C. [O’Rahilly and Müller, 1987]. Details of their processing is listed in Table 1. Images and the necessary technical data of these 2 specimens were either available through open-source sites [Cork and Gasser, 2017a] or publications [de Bakker

et al., 2016]. Unfortunately, the numbering of the sections of embryo CC10157 proved to be inconsistent since the “section number” and the “section location (slide number)” [Cork and Gasser, 2017c] are given in ascending and descending order, respectively. As a consequence, the left-right orientation of the embryo cannot be determined on the basis of the series of histological sections alone (see Results) but had to follow previous reconstructions [Cork and Gasser, 2017c]. The embryo “Dobbin” (Carnegie stage 8a) had been fixed after abortion and estimated to be recovered at 17 days post coitum (dpc) [Hill, 1931]; the histological sections are part of the collection of the Naturkundemuseum in Berlin, Germany. Embryo “Da1” (Carnegie stage 9 and estimated to be recovered at 21 dpc) had been found intraoperatively during a tubal sterilization [Ludwig, 1928]. It was registered last at the collection of the Institute of Anatomy of the University of Basel, but its current location is unknown.

#### *C. jacchus* Embryos

All animals used in this study were handled in accordance with the German Animal Protection Act (Deutsches Tierschutzgesetz) as described previously by Aeckerle et al. [2015]. Specifically, the collecting of *C. jacchus* embryos was approved under the license No. 42502-04-12/0708 at the Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety in Oldenburg, Germany. Animals originate from the self-sustaining *C. jacchus* colony of the German Primate Center (Deutsches Primatenzentrum) in Göttingen. One embryo donor (#14457) was 6 years and 5 months old at the time of sacrifice. The other one (#12944) was 7 years and 10 months old. Embryo donors were euthanized by intracardial injection of 0.5–1.0 mL Narcoren® (160 mg/mL pentobarbital; Merial GmbH, Hallbergmoos, Germany) in deep anaesthesia (0.05 mL diazepam, 0.05 mL/100 g body weight “Göttinger Mischung II,” applied intramuscular) prior to hysterectomy performed by an experienced veterinarian. Uteri were immersed in phosphate-buffered saline solution (PBS) at room temperature and the decidua was exposed as a whole by opening the peri- and myometrium as one unit using iridectomy scissors. Embryos were dissected by careful blunt separation of the intact decidua, photographed, and immediately fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature. Embryonic staging was carried out on the basis of the morphological criteria of the Carnegie staging system for human embryos [O’Rahilly and Müller, 1987] using dark field microscopy. The embryos were collected primarily for germ cell studies (see license No. 42502-04-12/0708) [Aeckerle et al., 2015]. Parts of the embryos not required for this purpose were used for this study and subjected to different embedding protocols after dissection: embryo GM79.01 (recovered at 46 dpc and classified as stage 8b) was dehydrated in a graded series of ethanol and stored in ethanol at –20 °C until its later use for whole-mount in situ hybridization (WISH, see below), after which Technovit® 8100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) served as embedding medium for high-resolution histology and cellular localization of *nodal* mRNA expression as described previously [Schröder et al., 2016]. Sections (5 µm) were transferred in pairs onto glass slides and a few glass slides were used for test staining (their WISH staining reaction remaining accidentally unphotographed) to identify the staining technique which would enable easy identification of cellular borders and thus detailed 3-dimensional reconstruction (3DR) afterwards (s.b.). Except for these test slides, sections were photographed using differential interference contrast without counter-

staining to visualize the staining reaction after WISH for *nodal* mRNA expression. After the WISH staining reaction was thus digitally recorded, all glass slides of GM79.01 underwent haematoxylin-eosin staining according to Gill for 20 min, which then obscured the *nodal* expression domain. Embryo GP.09.01 (recovered at 49 dpc and classified as stage 9) was fixed in Bouin solution (30% picric acid, 30% acetic acid, 4% formaldehyde in PBS), embedded in paraffin wax, and serially sectioned at 7 µm. The sections were placed on slides and stained with Harris haematoxylin for 1.5 min and eosin for 5 min [Bancroft and Layton, 2013].

#### *Whole-Mount in situ Hybridization*

The *C. jacchus nodal* cRNA probe was generated by in vitro transcription from PCR products of a cDNA template. In situ hybridization was performed according to the protocol described previously by Püschel and Jouneau [2015]. In short, the cryofixed specimen (100% ethanol at –20 °C) was rehydrated and treated with proteinase K for 15 min to guarantee infiltration of the *nodal* probe at the subcellular level, refixed for 20 min in 0.2% glutaraldehyde/PBS with Tween, followed by 1 h of pre-hybridization at 70 °C in hybridization buffer (formamide, saline sodium citrate buffer [pH 4.5], 0.5 mM EDTA, 10 mg/mL tRNA, 0.2% Tween 20, 10% CHAPS, and 50 mg/mL heparin). Subsequently, hybridization with 1 µL digoxigenin-labelled cRNA denatured at 95 °C was performed overnight at 70 °C. Excess cRNA was washed off using hybridization buffer and maleic acid buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 [pH 7.5]) prior to blocking unspecific antibody binding sites using maleic acid buffer with 2% Boehringer blocking reagent (Roche, Mannheim, Germany) and 20% heat-inactivated goat serum. Alkaline phosphatase-linked anti-digoxigenin antibody (Roche) was added, the specimen stored at 4 °C for 12 h, and the surplus antibody eluted with maleic acid buffer. The colour reaction with BM-purple substrate (Roche) lasted 4 days at room temperature in the dark and was stopped using alkaline phosphatase buffer (NTMT: 100 mM Tris, 100 mM sodium chloride, 50 mM magnesium chloride, 2 mM levamisole, 0.1% Tween 20) followed by PBS. Finally, the embryo was embedded in Mowiol® (Hoechst, Frankfurt, Germany) for whole-mount photography and processed for Technovit® embedding as described above.

#### *Three-Dimensional Reconstruction (3DR)*

Image acquisition was carried out with a Zeiss Axioplan 2 microscope and Zeiss AxioCam MRc resulting in red green blue (RGB) tagged image file format (TIFF) files at a resolution of 1,388 × 1,040 pixels. Section photographs, either viewed from left (for sagittal sections) or from caudal (for transverse sections), were aligned and digitally segmented manually with the open-source program “Fiji-ImageJ-win64” and its plugin “TrakEM2” [Schindelin et al., 2012]. The *x*- and *y*-axes were adjusted (a) according to the known µm/pixel ratio of the camera used (for 93.2.2; Dobbin; CC10157; GM79.01; GP09.01) or (b) according to an estimate of the µm/pixel ratio using measurements of published data (see O’Rahilly and Müller [2006] for CC8671 and Ludwig [1928] for Da1). Colours were applied independently from the ones found at source (own photographs, internet, publication) as follows: blue for neurectoderm, red for mesoderm, green for basement membrane, and purple for notochordal plate. In embryo GM79.01 beige was used for the area of *nodal* expression; *nodal* segmentation had to be interpolated for those few sections in which the WISH signal



was obscured by the counterstaining before the 3DR had been carried out.

Two methods of reconstruction (called “narrow” and “wide,” respectively) were established to give consideration to the fact that some structures of interest were smaller than the section thickness [for further explanations, see the online supplementary information (see [www.karger.com/doi/10.1159/000493276](http://www.karger.com/doi/10.1159/000493276) for all online suppl. material)]. As a general quality check, all reconstructions were compared to pre-sectioning stereo-microscope images or published reconstructions with regard to size and shape of “macroscopic” features such as the overall shape of the embryonic disc or morphological left-right asymmetry. If necessary, adjustments were made by realignment of the sections. Adobe Acrobat Pro ([www.adobe.com](http://www.adobe.com)) was used for creating 3D-PDF files (available in the online suppl. material). Using the software “MakerBot print” and the 3D printer “MakerBot replicator” ([www.makerbot.com](http://www.makerbot.com)), a physical 3D model of the central embryonic disc region of GM79.01 and measuring  $10 \times 6 \times 3$  cm was created.

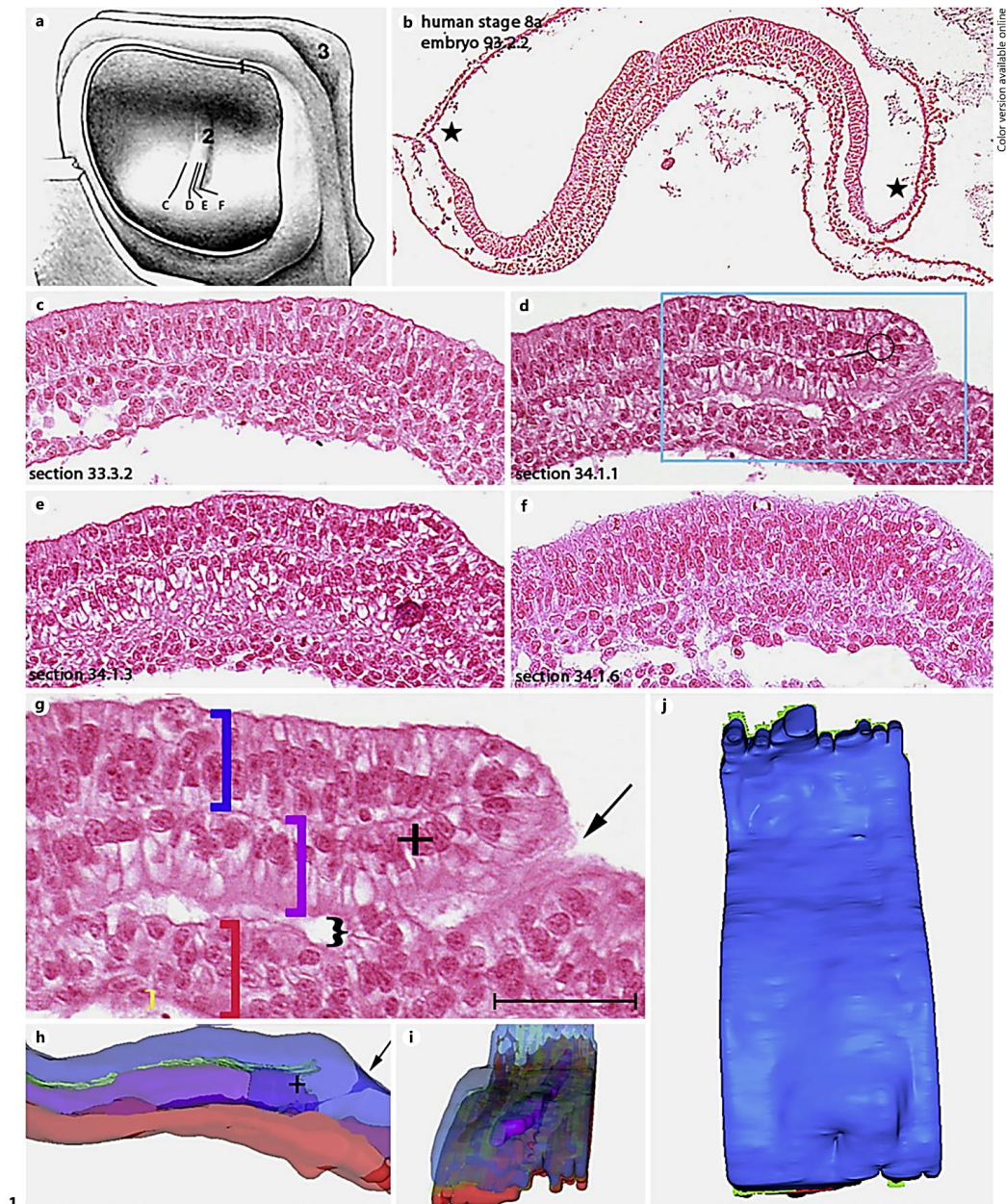
## Results

### *Morphology of Human Embryos*

The new human stage 8a embryo available for this study (designation 93.2.2) has an elongated embryonic disc which measures  $1.1 \times 0.9$  mm (see Fig. 1a, taken from Sander [2001]), displays a short allantois and separates 2 voluminous cavities: the yolk sac and the amniotic cavity. In the dorsal view of the reconstruction (Fig. 1a), the anterior-posterior axis is marked by a narrow thickening measuring 0.3 mm in length which is caused by the developing notochord; the future cranial pole of the embryo is marked by the anterior extremity of the notochord while the future caudal pole is marked by the posterior attachment of the notochord to the primitive node, the latter being remarkably inconspicuous in this specimen. The serial sagittal paraffin sections through the embryonic disc confirm the longitudinal S-shaped configuration of the germ layers with the (dorsal) neuroectodermal layer consisting of cylindrical cells near (Fig. 1c, e, f) and within (Fig. 1d, g) the median plane and continuing anteriorly and laterally in the cuboidal cell layer of the epidermal ectoderm. At the anterior and lateral borders of the embryonic disc, the row of cuboidal ectoderm cells bends dorsally and is connected – without a definite border – to the squamous epithelium of the amnion. High magnification (Fig. 1g) reveals subcellular details in the neuroectoderm such as (a) nuclei which are large relative to the cytoplasmic volume and which have distinct nuclear membranes and nucleoli, (b) apically placed “mitotic figures” from various stages of mitosis (Fig. 1e), (c) differentiation of low-density cytoplasmic sub-regions either apical or basal to the interphase nuclei indicating a high degree of

vacuolization, and (d) an almost continuous line basally representing the position of the basement membrane. Ventrally adjacent to the neuroectoderm lies the notochord which consists of an inverted simple epithelium with basally positioned nuclei (i.e., close to the basement membrane of the neuroectoderm) and cytoplasmic sub-regions of low density positioned towards the apical extremities of the cells (Fig. 1g). The basal row of cell nuclei of the notochord epithelium is also visible in parasagittal sections (Fig. 1c, e, f) and continues cranially furthest in the median plane, where it touches the irregularly arranged prechordal mesoderm cells near the dorsal bend of the neuroectoderm (Fig. 1b). In its midline position, the simple epithelium of the notochord forms the dorsal part of the axial mesoderm and it is ventrally covered by a mesenchymally differentiated part of the axial mesoderm which is characterized by numerous small cells and a stochastic positioning of cell nuclei (Fig. 1g). In its position ventral to the notochordal epithelium and due to its caudal continuation with the mesodermal cells of the primitive streak, this mesenchymal axial mesoderm will be addressed here as SCM in accordance with observations made in the chick [Tsikolia et al., 2012] and several non-primate mammals [Schröder et al., 2016]. The SCM itself is covered – similar to the primitive streak mesoderm further posteriorly – by a single layer of squamous hypoblast cells (Fig. 1g) which continues laterally as yolk sac epithelium (not shown). In its caudal third, the epithelial part of the notochord is separated from the SCM by several narrow translucent extracellular spaces which are connected to each other by somewhat narrower semi-translucent extracellular spaces; taken together these spaces measure  $180 \mu\text{m}$  in length,  $10 \mu\text{m}$  in width, and  $10 \mu\text{m}$  in height. Towards the cranial extremity of the notochord epithelium, this extracellular space tapers out, but caudally, in contrast, the clear extracellular space is connected to the amniotic cavity by a further stretch of semi-translucent extracellular space, which shows honeycomb-like structures indicating the apical cortex of tangentially sectioned epithelial cells in the lateral wall of this dorsal opening to the amniotic cavity (Fig. 1g).

At the caudal end of the neuroectodermal basement membrane, both neuroectoderm and notochordal epithelium are connected by epithelial cells which are radially arranged and tend to have their cell nuclei positioned basally; their apical surfaces are in contact serially with the amniotic cavity dorsally and the semitranslucent extracellular spaces ventrally. This arrangement is typical for an epithelial sheet undergoing involution around a hinge which presents itself as a narrow point in sections



(For legend see next page.)

through the median plane (Fig. 1e) and may continue laterally to form a broader ledge. Posterior to the cranial rim of the primitive node a distinct primitive pit typical for most non-rodent mammalian embryos [Hensen, 1876] is seen in this specimen (Fig. 1b); the conspicuous radial arrangement of epithelial cells within the cranial rim of the node is therefore addressed here as hinge of involuting notochordal cells (HINC) in accordance with the terminology on cell movement during gastrulation summarized by Gilbert and Barresi [2016]. With this definition, HINC is principally different from the “chordoneural hinge” of Pasteels [1943], Gont et al. [1993], and Cambray and Wilson [2002], because the latter is an area of proliferating cells for both neuroectoderm and axial mesoderm during secondary neurulation either in the late dorsal blastopore lip (of amphibia) or the tail bud (in amniotes), respectively. As a further conspicuous feature of the specimen 93.2.2, the right side of the primitive node is higher, and the nuclei are more frequently round and arranged in more layers than on the left side (cf. Fig. 1c, f). Therefore, both these lateral parts of the primitive node will be addressed as “node shoulders” in analogy to the situation found in the chick [Tsikolia et al., 2012].

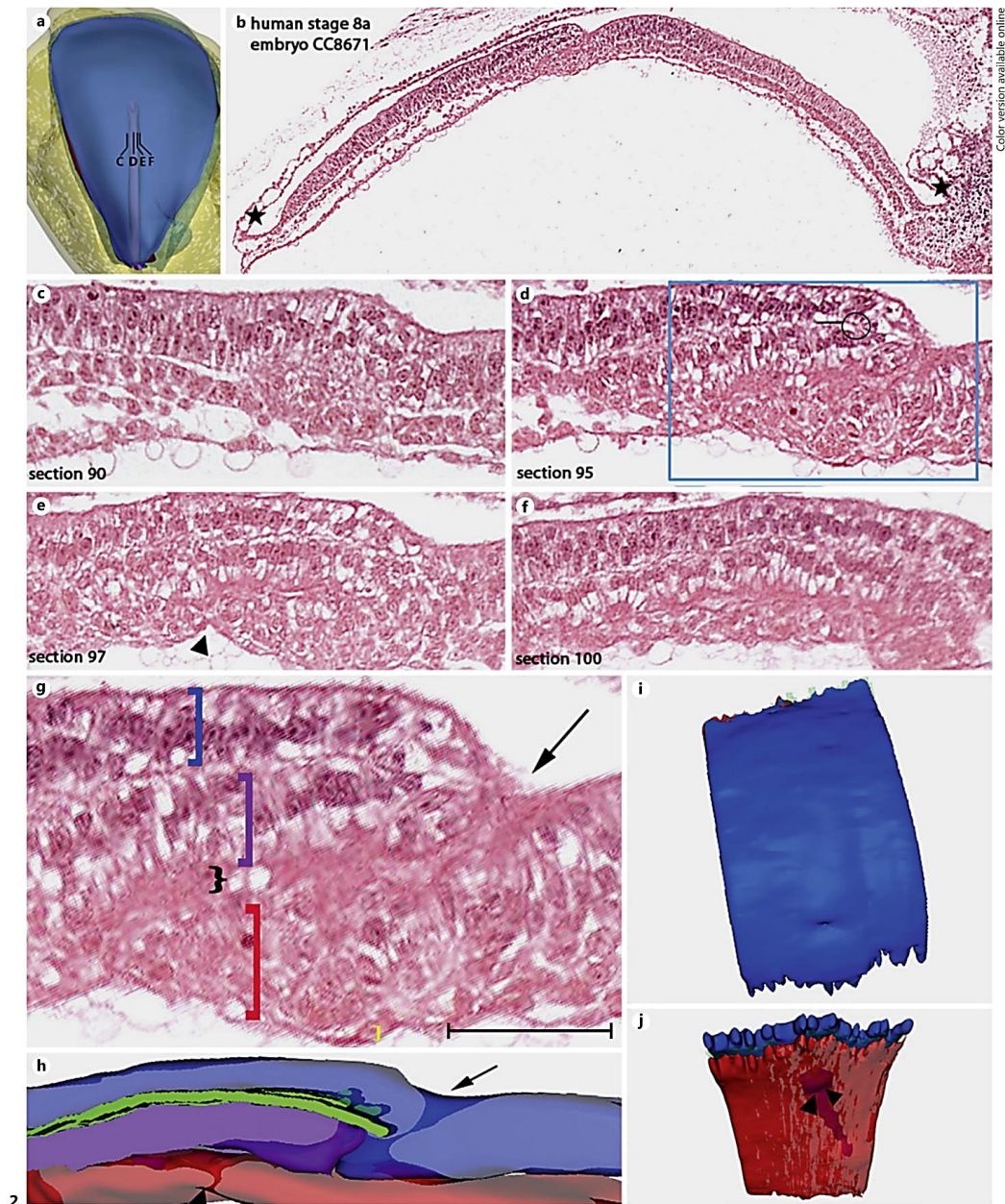
The (dorsal) epithelial part of the notochord gives the notochord a plate-like shape extending from the HINC at its caudal extremity to the prechordal mesoderm at its cranial extremity. This homogeneous epithelial differentiation in contradistinction to the underlying SCM is the basis for addressing the notochord in the description of this and the following stages as the “notochordal plate.” This encompassing definition used here facilitates (1) the identification of dorsal and ventral parts of the axial mesoderm prior to the intercalation of the dorsal wall of the notochordal process into the endoderm and prior to the formation of the notochordal canal, (2) addressing the

extracellular spaces between dorsal and ventral parts of the axial mesoderm as a notochordal canal still intact (in accordance with the original description by Lieberkühn [1882] and previous descriptions in early stage 8 human embryos [Strahl, 1916; Rossenbeck, 1923; O’Rahilly and Müller, 1981]), and (3) describing the transition of the caudal part of the notochordal canal into the neurenteric canal by local disintegration of the SCM (see van Beneden [1888] and O’Rahilly and Müller [1981], and below).

In 3DRs, the following 4 morphological characteristics become apparent as the salient structures surrounding the notochordal canal. Firstly, the dorsal opening of the notochordal canal is recognized in the region of the primitive node to be completely surrounded by epithelial cells, while the notochordal canal is visible between the notochordal plate and the SCM (Fig. 1h). Secondly, the node rises from left to right and has a steep “descend” lateral to the right shoulder (Fig. 1j), and the basement membrane in the area of the node just anteriorly and laterally of the canal, where the epithelium involutes, and under the right half of the notochordal plate (Fig. 1i). Thirdly, the notochordal plate runs diagonally from posterior-left to anterior-right, even though the sectioning axis diverges – in this part of the embryo – from the longitudinal axis of the embryo to the left. The first epithelial cells standing perpendicularly on the basement membrane after turning by 180° through the HINC were hereby defined as the cranial transition point between neuroectoderm and notochordal plate, and this is indicated by a colour change from blue (for neuroectoderm) to purple (for notochordal plate; see Fig. 1g, h). Finally, the primitive streak – identified by a missing basement membrane and a dorsal groove in the epiblast epithelium – forms with its (epithelial) epiblast cells the ventro-caudal wall of the dorsal opening of the notochordal canal.

**Fig. 1.** Human stage 8a embryo (specimen No. 93.2.2). **a** Dorsal view of the 3D reconstruction in Sander [2001]: 1, cut edge of the opened amniotic cavity; 2, notochord; 3, proximal rim of the opened yolk sac. C–F, position of sections shown in **c–f**. **b** Low magnification of the median section shown in **d** displaying the bent embryonic disc (borders marked by black asterisks). **c–f** Left paramedian (**c**), median (**d**), and right paramedian (**e**, **f**) sagittal sections (section numbers indicated at the bottom left) at higher magnification. Blue box marks the area shown at high magnification in **g**. Black circle with line attached is centred on (the median part of) the hinge of involuting notochord cells. **g** High magnification of the area marked in **d** displaying the cellular composition of the neuroectoderm (blue square bracket), notochordal plate (purple square bracket), subchordal mesoderm (red square bracket),

hypoblast (yellow square bracket), and notochordal canal (curved bracket). Black arrow marks the dorsal opening of the notochordal canal, black cross marks the caudal-most notochordal plate cell at the transition between neuroectoderm and notochordal plate. **h** Left lateral view of a “wide” semitranslucent reconstruction using 8 sections. Colour coding as used in **g**; green marks the basement membrane, black arrow and black cross markings as in **g**. A transition zone between neuroectoderm and notochordal plate is highlighted by an intermediate colour (blue-purple) between blue (for neuroectoderm) and red-purple (for notochordal plate). **i** Right dorsal semitransparent view of a “narrow” reconstruction, depicting the whole size of the notochordal plate (purple). Colours as in **g**. **j** Dorsal view of a “narrow” reconstruction. Scale bar: **a** 650 µm. **b** 300 µm. **c–f** 100 µm. **g** 50 µm.



(For legend see next page.)

The embryonic disc of the second human stage 8a embryo (designation CC8671) was in toto reconstructed by de Bakker et al. [2016; Fig. 2a] its preservation status being deemed excellent [O’Rahilly and Müller, 1987]: it is pear-shaped and 1.38 mm long (Fig. 2b, see O’Rahilly and Müller [2006]). The primitive streak together with the notochordal plate indicates the orientation of the anterior-posterior axis which diverges from the longitudinal axis of the sagittal sections (Fig. 2c–f) by about 10° to the left. A distinct primitive pit is visible caudally adjacent to the primitive node and continues as a canal (measuring 145 µm in length, 40 µm in width, and 6 µm in height) between the developing notochordal plate and the SCM when examined in median histological sections (Fig. 2d, g). This canal-like structure is composed of occasional clear extracellular spaces and dense areas displaying honeycomb-like structures of apical cell membranes cut tangentially while its dorsal and ventral walls show identical cellular arrangements and subcellular structures as the notochordal canal in the embryo 93.2.2 (see above). Similarly, the neuroectoderm shows apically arranged mitotic figures and low-density subcellular regions apically and basally of interphase nuclei as in the embryo 93.2.2, and the HINC, too, is recognizable as the transition between neuroectoderm and notochordal plate within the cranial rim of the primitive node. Taken together, these histological features are the basis for addressing this canal-like structure as a shorter version of the bona fide notochordal canal described for 93.2.2.

Remarkably, the hypoblast layer shows 2 ventral indentations protruding into the adjacent SCM (Fig. 2e). With reference to the increasingly regressing ventral wall of the notochordal canal during Carnegie stage 8 [cf. O’Rahilly and Müller, 1987], these indentations are ad-

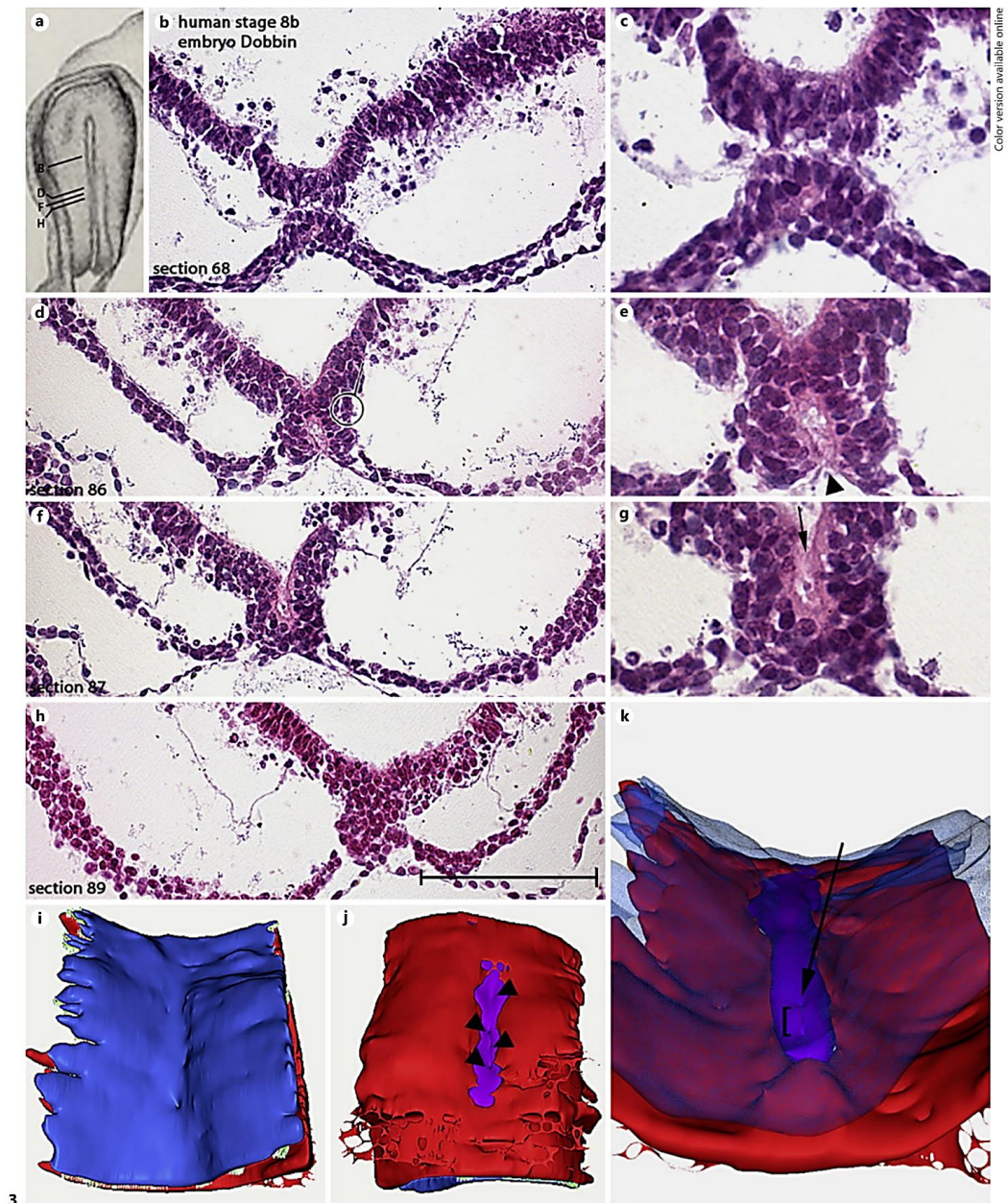
ressed as incipient connections of the notochordal canal with the yolk sac cavity. However, on the basis of the length of the notochordal process, this embryo is considered to be less advanced in development than the specimen 93.2.2 in which similar indentations of the hypoblast are not found (cf. Fig. 1d).

To the left side of the primitive node, the ectoderm is elevated mainly due to the bulging of the SCM which covers the notochordal plate ventrally at the level of the HINC and displaces the ectoderm towards the dorsal surface (Fig. 2c). The epithelium itself is almost symmetrical and contains oval nuclei on either side (Fig. 2c–f). Also, in the 3DR, the ectoderm appears symmetrical, which is apparent despite the oblique course of the notochordal plate (Fig. 2i). The dorsal opening of the notochordal canal is seen in the lateral view of a “wide” reconstruction (see results below, Fig. 2h), as is the ventral hypoblast indentation into the SCM just anterior to the primitive node (Fig. 2j).

Of the two human stage 8b embryos analyzed in this study, the embryo “Dobbin” (first description by Hill and Florian [1931]) is still pear-shaped and about 0.98 mm long from the anterior margin of the embryonic disc to the cloacal membrane (Fig. 3a). The cellular borders and intracellular organelles are difficult to identify in the histological sections due to the poorer quality of tissue preservation than of the specimens described above; apical low-density cytoplasmic regions and apical cell contacts, however, are discernible as, for example, in some cells lining the notochordal canal (Fig. 3e). Inside the caudal extremity of the notochordal process (which measures 360 µm in length; Fig. 3b), a patent canal is seen running almost vertically through all 3 germ layers (Fig. 3d–g). As this embryo was serially sectioned in the transverse plane, the

**Fig. 2.** Human stage 8a embryo (specimen No. CC8671; section images obtained at: <http://3datlas.3dembryo.nl/>). **a** Dorsal view of the 3D reconstruction in de Bakker et al. [2016] displaying primitive streak (purple), proximal rim of yolk sac (yellow), and embryonic disc (blue) with cut edge of amnion. C–F indicate section planes shown in **c–f**. **b** Low magnification of section 95 shown in **d** displaying the straight embryonic disc (borders marked by black asterisks). **c–f** Left paramedian (**c**), median (**d**), and right paramedian (**e**, **f**) sagittal sections (section numbers indicated at the bottom left) at higher magnification. Blue box marks the enlarged area shown in **g**. Black circle with attached line is centred on (the median part of) the hinge of involuting notochord cells. Black arrowhead in **e** marks the ventral indentation of the hypoblast as an indication of an open connection developing between the notochordal canal and the yolk sac cavity. **g** High magnification of the area marked in **d** displaying the cellular composition of neuroec-

toderm (blue square bracket), notochordal plate (purple square bracket), subchordal mesoderm (red square bracket), hypoblast (yellow square bracket), and notochordal canal (curved bracket). Black arrow marks the dorsal opening of the notochordal canal. **h** Left lateral view of a “wide” semitranslucent reconstruction using 6 sections. Colours as in **g**; green marks the basement membrane. Black arrowhead marks the ventral hypoblast indentation as a potential ventral opening of the notochordal canal, black arrow marks its dorsal opening. **i** Dorsal view of a “narrow” reconstruction showing the neuroectoderm with the dorsal opening of the notochordal canal and the oblique course of the notochordal plate. **j** Ventral view of a narrow reconstruction showing the whole length of the notochordal plate. Black arrowheads mark the positions of the ventral indentations as potential openings of the notochordal canal. Scale bar: **a** 880 µm. **b** 330 µm. **c–f** 100 µm. **g** 50 µm.



3

(For legend see next page.)

canal displays (1) a dorsal opening (measuring  $6 \times 4 \mu\text{m}$ ) in the caudal-most section (Fig. 3f, g), (2) an almost complete ventral opening in the cranial-next section (Fig. 3d, e), and (3) a continuation in a central position in several sections further cranially (Fig. 3b, c). In its central position within the notochordal process, the canal is lined dorsally by the notochordal epithelium (notochordal plate) and ventrally by the irregular arrangement of SCM cells (Fig. 3c). In this way, the notochordal canal continues as a longitudinal canal in the anterior half of the notochordal process with a length of about  $280 \mu\text{m}$  and can, therefore, be addressed as a notochordal canal running longitudinally within the notochordal process as described above for the stage 8a embryos. The part of the canal which is running vertically, however, is addressed as a bona fide neurenteric canal – running from caudodorsal to cranioventral – as originally defined in the human by von Spee [1889], Gasser [1924], and lately by O’Rahilly and Müller [1987]. As will be seen in the 2 other human embryos (stage 8b: Fig. 4; stage 9: Fig. 5) and in the non-human primates described below (Fig. 6, 7), this vertical canal is lined by epithelial cells laterally which are connected dorsally with the neuroectoderm by cellular arrangements (Fig. 3d, e) closely resembling the HINC described in the median plane in the 2 stage 8a human embryos (Fig. 1g, 2g). The transverse sections of this specimen, therefore, facilitate the definition of the HINC in the lateral walls of the dorsal opening of the neurenteric canal (Fig. 3d) which turn the median ledge-shaped HINC into a horseshoe-shaped area of involution. Furthermore, the transverse sections show the incipient intercalation of the ventral opening into the hypoblast (Fig. 3e). In the next section further caudally (Fig. 3g), the canal is seen to be limited by cells connected to the primitive streak (Fig. 3h) whereby the transverse orientation of the sections precludes a definition of these cells in the

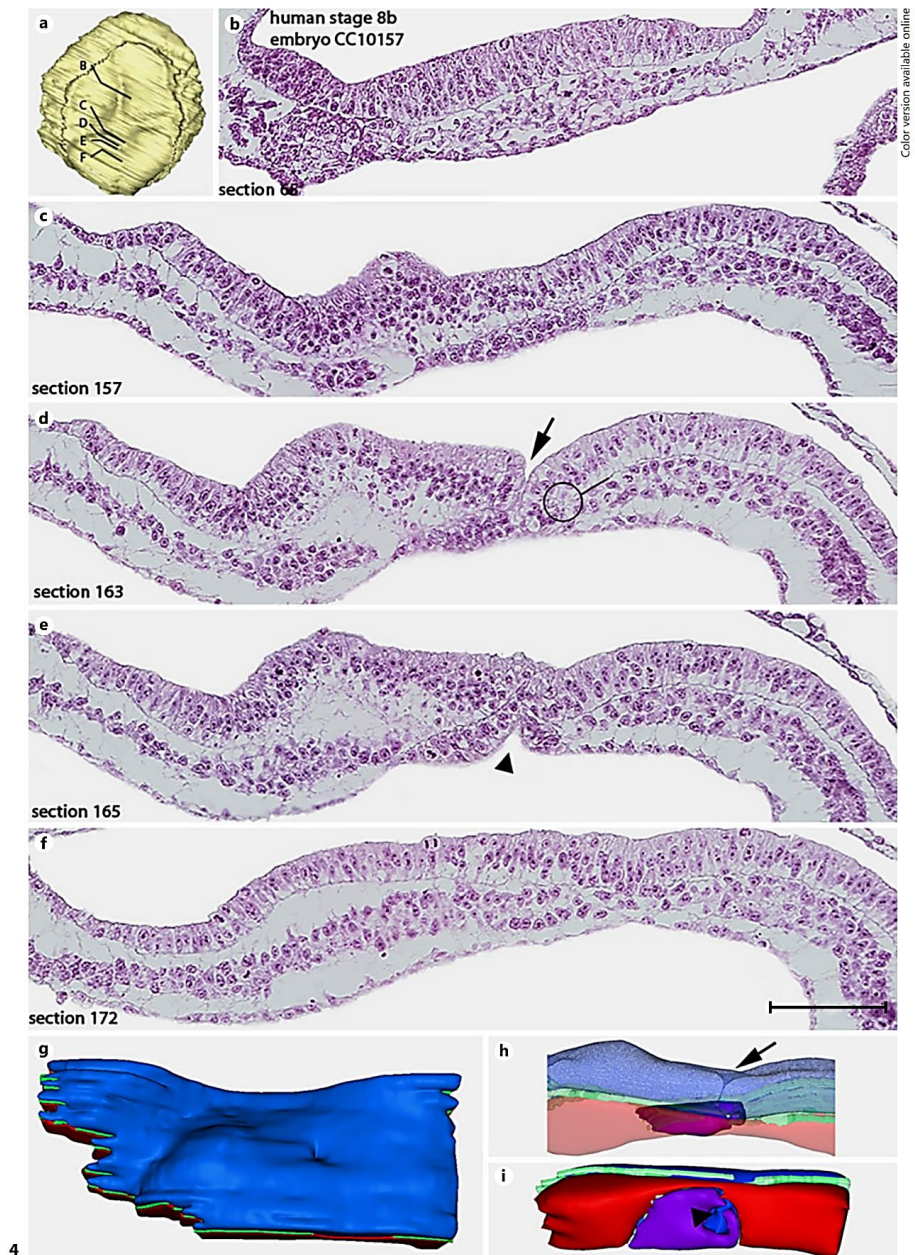
caudal wall of the neurenteric canal as epithelial versus mesenchymal.

Interestingly, the right side of the ectoderm immediately cranial to the dorsal opening of the neurenteric canal nearly doubles the left side in height and amount of nuclei (Fig. 3b). This leads to a bulging of the right parachordal ectoderm in the 3DR measuring about  $120 \mu\text{m}$  in length (Fig. 3i). The 3DRs also show that the neurenteric canal lies immediately posterior to the primitive node (Fig. 3i, k). Caudally, the appearance of bottle cells undergoing epithelial-mesenchymal transition indicates the cranial-most (epithelial) epiblast cells of the primitive streak which are intercalated medially into the notochordal plate domain at the caudal border of the neurenteric canal. The posterior aspect of the neurenteric canal is surrounded dorsally by epiblast cells (coloured blue) and ventrally by notochordal cells (coloured purple in the 3DR). By taking the HINC as a regular wall structure into account, the neurenteric canal is thus shown to be surrounded by epithelial cells in its entire circumference (Fig. 3k). The ventral indentations in the SCM which may form openings of the longitudinal canal under the notochordal plate at later stages are visible when looking at the caudal aspect of the 3DR (Fig. 3j).

The other human stage 8b embryo analyzed in this study (designation CC10157; with excellent preservation according to O’Rahilly and Müller [1987]) has a large oval embryonic disc measuring  $1.16 \text{ mm}$  in its greatest diameter and is likely to possess a preparation artefact as stated by Cork and Gasser [2017b]. However, the region around the primitive node seems to be well preserved and suitable for high-resolution morphological analysis (Fig. 4a). Taking into account that the sectioning axis deviates from the transverse axis by about  $20^\circ$  clockwise to the right, a narrow and oblique canal between the amniotic and yolk sac cavity visible in 3 consecutive sections through the node

**Fig. 3.** Human stage 8b embryo (specimen name “Dobbin”). **a** Dorsal view of the 3D reconstruction in Hill and Florian [1931] displaying the notochord, primitive streak, cut edge of amnion, and proximal parts of the yolk sac. B, D, F, and H indicate the position of the transverse sections shown in **b–h** (section numbers indicated at the bottom left). **b, c** Cranial transverse section illustrating the closed notochordal canal in its cranial half at low (**b**) and high (**c**) magnification (note the wide bilateral artefactual extracellular space between neuroectoderm and mesoderm). **d, e** Transverse section through the posterior extremity of the notochordal plate illustrating the ventral opening of the neurenteric canal. Black circle with line attached marks the presumed position of the hinge of involuting notochord cells in the lateral wall of the

neurenteric canal. Black arrowhead marks the ventral opening of the neurenteric canal. **f, g** Transverse section next to the section shown in **d** and **e** displaying the dorsal opening of the neurenteric canal (black arrow). **h** Transverse section through primitive streak forming the caudal wall of the neurenteric canal. **i** Dorsocaudal view of a “narrow” reconstruction using 55 sections displaying the dorsal surface of the ectoderm. **j** Ventral caudal view of a “narrow” reconstruction displaying the ventral openings of the neurenteric canal and the notochordal canal (black arrowheads). **k** Caudodorsal view of a “narrow” semitranslucent 3D reconstruction using 55 sections and displaying the dorsal opening of the neurenteric canal (black arrow) and its course through the embryonic disc (black square bracket). Scale bar: **a**  $1 \text{ mm}$ . **b, d, f, h**  $300 \mu\text{m}$ . **c, e, g**  $100 \mu\text{m}$ .



(For legend see next page.)



area (Fig. 4d, e) can be defined to run almost perpendicularly from the cranial-right to the caudal-left and to have a diameter of 4  $\mu\text{m}$ . The canal is addressed as a bona fide neurenteric canal also because it is lined laterally by epithelial cells (Fig. 4d, e) which are connected to the neuroectoderm through a HINC (see Fig. 4d) as in the embryo Dobbin (Fig. 3d). In comparison to this embryo, however, there is a wider zone of ventral columnar-epithelial cells intercalated into the hypoblast and forming a cone surrounding the ventral opening of the neurenteric canal; this is similar to the situation found in the stage 8b *Callithrix* specimen described below (Fig. 6, 7). The columnar-epithelial cells of this cone are found caudal and lateral (Fig. 4e; to the right) as well as cranial and lateral (Fig. 4e; to the left; Fig. 4d; to the left) to the neurenteric canal and, further cranially, connect to the broad notochordal plate intercalated into the hypoblast (Fig. 4c); caudally they are attached to the adjacent primitive streak (Fig. 4f). Altogether, the notochordal plate is 650  $\mu\text{m}$  long, and the apical surface of its epithelial cells has a direct connection to the yolk sac cavity (Fig. 4c). At the very cranial end of the notochordal plate, a cluster of cells with an irregular arrangement form the anterior-most part of the notochord (Fig. 4b) and contains several extracellular cavities which resemble the remains of a notochordal canal although the latter is not clearly definable in this embryo. However, the length and width of the notochordal plate and the absence of a clear notochordal canal gives this embryo a more advanced appearance than the 2 other stage 8b embryos described in this study. According to the left-right orientation given on the digital source of this series of sections [Cork and Gasser, 2017c], it is the left parachordal ectoderm which presents itself as a thickened epithelium near the primitive node. Its cells form multiple layers of cuboidal cells over a length of 130  $\mu\text{m}$  (Fig. 4c).

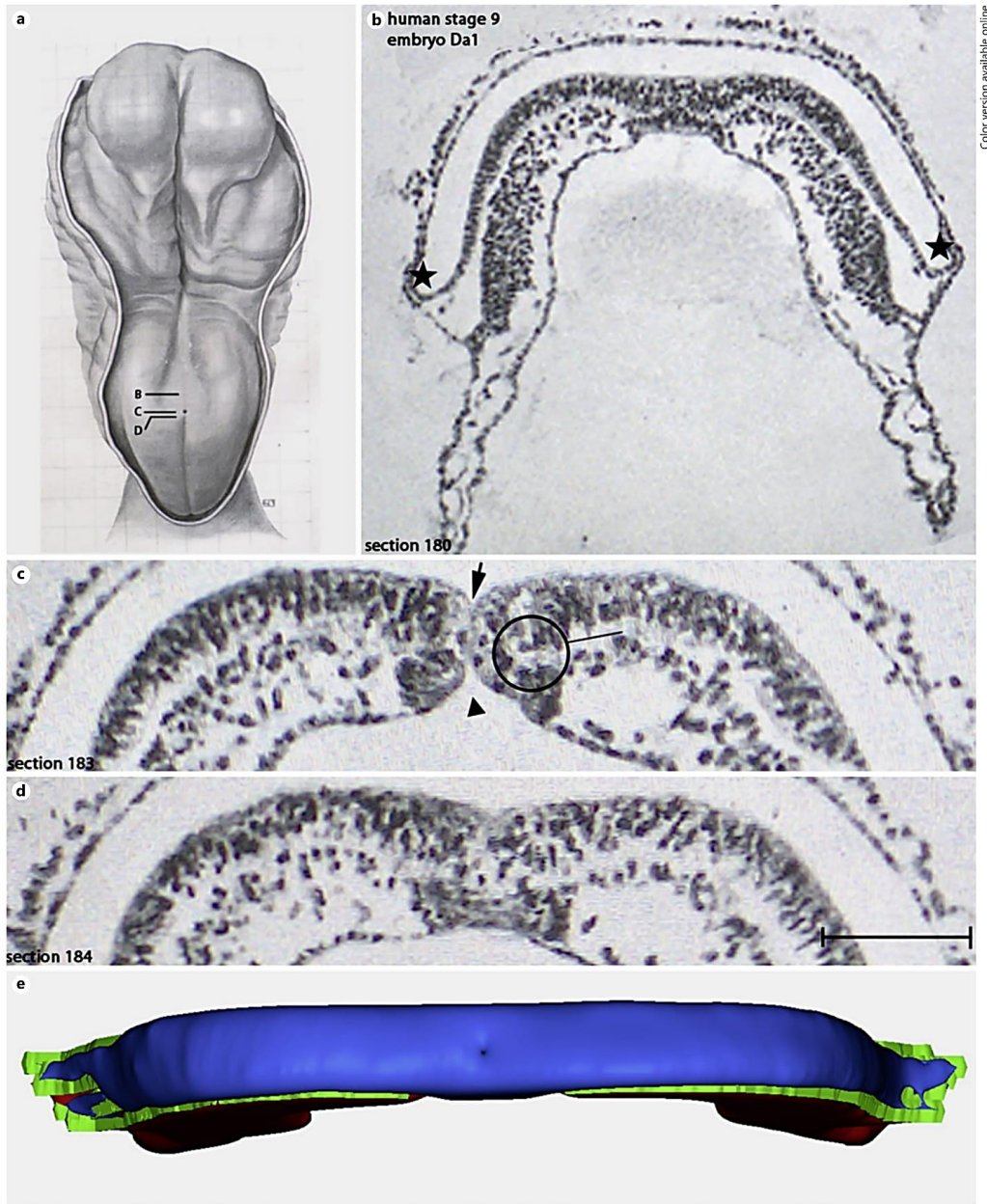
In 3DRs, too, the left parachordal ectoderm appears markedly elevated (Fig. 4g); the lack of a basement mem-

brane in its centre is most likely due to its artificial dislocation into an oblique position as part of a fixation artefact. The patent canal running from right to left lies medially adjacent to this thickening (Fig. 4h; “wide” reconstruction). In the ventral aspect of this reconstruction, the epithelial cone forming the ventral opening of the neurenteric canal is visible (Fig. 4i; “wide” reconstruction).

The embryonic disc of the human embryo “Da1” [Ludwig, 1928] chosen to represent stage 9 in this study is sole-shaped and bent into a marked lordosis (Fig. 5b); it measures 2.4 mm in length [Ludwig, 1928]. The presentation of the histological sections (Fig. 5b–d) had to be taken from a printed publication [Ludwig, 1928] with the effect that the cellular borders are difficult to determine. Cranially, the neuroectoderm displays bilaterally symmetrical, broad neural plates while the centre of the embryonic disc shows elevated neural folds and holds one pair of somites (Fig. 5a). The specimen has a clear perpendicular neurenteric canal immediately anterior to the primitive streak and is limited anteriorly by cells of the floor plate and laterally by the neuroectoderm bent (and representing the node shoulders) around the lateral part of the HINC (Fig. 5c); the HINC is defined by the medial edge of the basement membrane of the neuroectoderm similar to the situation in the specimens of stage 8b described above (Fig. 3, 4). The neuroectoderm thus forms a ventrally oriented cone of epithelium which is continuous with the notochordal plate laterally, cranially (Fig. 5b, c), and also caudally (Fig. 5d); here, a cluster of epithelial cells ventral to the neuroectoderm represents the posterior continuity of the notochordal plate intercalated into the hypoblast in the median plane (Fig. 5d). The walls of the neurenteric canal touch each other in its dorsal half, which gives the canal a narrow appearance. Although similar in shape, the right node shoulder contains more nuclei (and thus more cells) than the left node shoulder (Fig. 5c). The para-

**Fig. 4.** Human stage 8b embryo (specimen No. CC10157). **a** Dorsal view of a reconstruction created by Cork and Gasser [2017c] indicating the embryonic disc borders (cut edge of the amnion) and the proximal rim of the yolk sac. B–F indicate the position of transverse sections shown in **b–f** (section numbers are taken from Cork and Gasser [2017c] and are indicated at the bottom left). **b** Transverse section showing the cranial end of the notochordal plate. **c** Transverse section through the posterior part of the notochordal plate showing lateral asymmetry in the neuroectoderm. **d** Transverse section containing the dorsal opening of the neurenteric canal (black arrow) and hinge of involuting notochord cells in the lateral wall of the neurenteric canal (black circle with line at-

tached). **e** Transverse section containing the ventral opening of the neurenteric canal (black arrowhead). **f** Transverse section through the centre of primitive streak. **g** Dorsal view of a “narrow” 3D reconstruction indicating the dorsal surface of the ectoderm. **h** Caudal view of a “wide” semitranslucent 3D reconstruction using 16 sections and indicating the course of the neurenteric canal. Black arrow marks the dorsal opening of the neurenteric canal. **i** Ventro-caudal view of a “wide reconstruction” displaying the ventral cone of the notochordal plate surrounding the ventral opening of the neurenteric canal. Black arrowhead marks the ventral opening of the neurenteric canal. Scale bar: **a** 800  $\mu\text{m}$ . **b–f** 100  $\mu\text{m}$ .



5

(For legend see next page.)

chordal ectoderm consists of columnar to cuboidal cells and appears symmetrical in shape.

3DR reveals the dorsal opening of the neurenteric canal (Fig. 5e), similar to the original plaster model generated by Ludwig [1928] (Fig. 5a). The neuroectoderm appears symmetrical on both sides of the embryonic disc, which is much like its appearance in the sections.

#### *Morphology of C. jacchus Embryos*

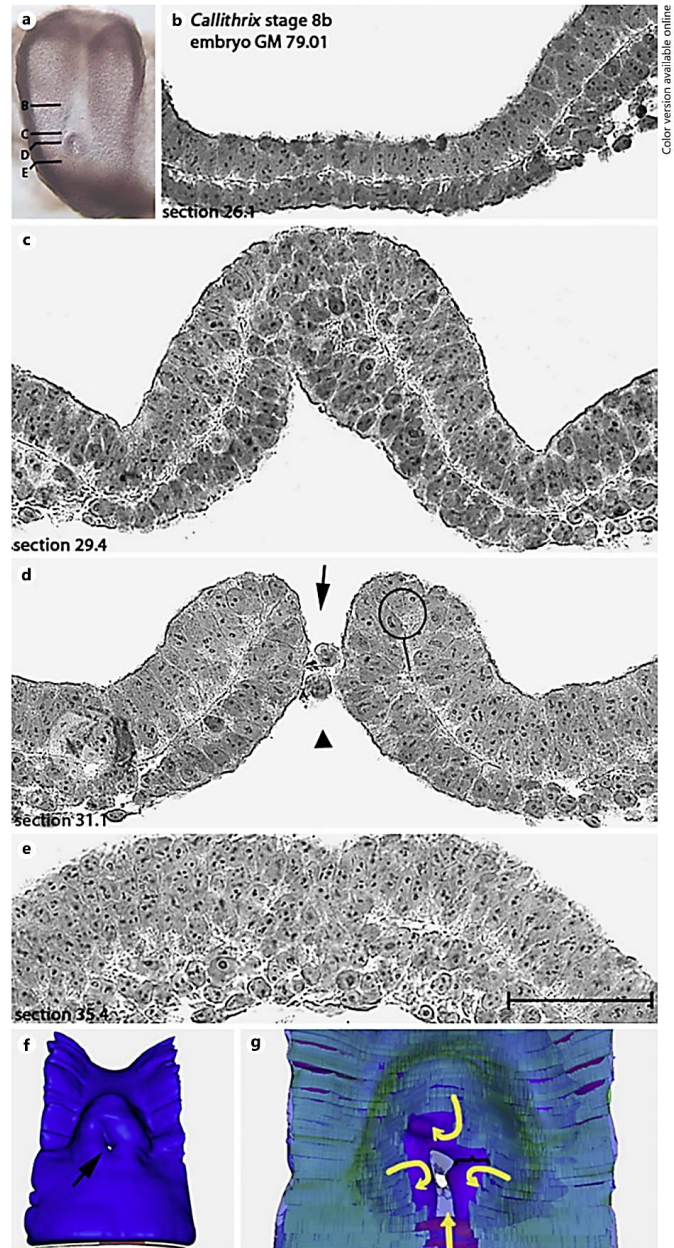
Whole-mount views of the stage 8b *Callithrix* embryo made available and dissected for this study (specimen No. GM79.01) reveal an embryonic disc with a neural plate bent ventrally at its cranial and lateral borders to join the epidermal ectoderm, a short allantoic diverticulum, and the cut margins of the yolk sac and the amniotic cavity both of which had been opened peripherally. The whole embryonic disc measures  $1.2 \times 0.68$  mm with the primitive streak marking the posterior (or caudal) one-third, and with a translucent notochordal plate marking the anterior (or cranial) two-thirds of the total length of the anterior-posterior axis (Fig. 6a). In the posterior part of the embryo, at the transition between primitive streak and notochordal plate, the primitive node is visible with a dense left and a less dense right node shoulder, which are connected anterior to the node and together flank an almost translucent primitive pit on both sides. The transverse Technovit® sections reveal the neuroectoderm to be composed of a pseudostratified epithelium with centrally placed cell nuclei and occasional mitotic figures near the apical surface (Fig. 6b–e). Within both node shoulders, this epithelium bends by  $180^\circ$  around a hinge point which is defined by the medial edge of the neuroectoderm basement membrane and, therefore, is equivalent to the HINC described above in the human embryos (Fig. 1g, 4d, 5c). Lateral to each of these 2 HINC, the basement membranes separate the notochordal plate underneath from neuroectoderm above. The notochordal plate presents a cuboidal epithelium between the node and the prechordal mesoderm, and is  $650 \mu\text{m}$  long and maximally  $140 \mu\text{m}$  wide immediately anterior to the node. It has direct con-

tact ventrally to the yolk sac cavity and laterally to the paraxial mesoderm, which itself is ventrally covered by a layer of squamous hypoblast cells. Between the 2 HINC, i.e., in the centre of the primitive node, an oval lumen ( $40 \mu\text{m}$  long and  $8 \mu\text{m}$  wide) connects the amniotic cavity and the yolk sac cavity and is, therefore, addressed as a bona fide neurenteric canal as described above for human embryos at stages 8b and 9 (cf. Fig. 5c). In the stereomicroscope, loose cellular debris had been seen to move in and out of the neurenteric canal during handling of the intact yolk sac of this specimen and was found, after embedding, to be trapped in the ventral opening of the neurenteric canal (Fig. 6d). The canal is fully surrounded by a cone of pseudostratified epithelium (Fig. 6c, d) in which cell nuclei are positioned without preference either towards the basement membrane shared with the overlying neuroectoderm or towards the apical surface of the notochordal plate facing the yolk sac cavity. The cranial and lateral two-thirds of this cone are formed by the notochordal plate gently bent from an almost vertical into a horizontal position. Laterally, this cone is attached to the hypoblast (Fig. 6c, d). The caudal part of the cone consists of irregularly arranged epithelial cells (a) of the notochordal plate ventrally, and (b) of the primitive streak (epiblast) dorsally, without clear separation, however, from the more caudal parts of the primitive streak. Next to the entire length of the primitive streak, the ectoderm, mesoderm, and hypoblast layers, and a continuous basement membrane between the first two are easily distinguishable in the paramedian planes; in the median plane, however, the basement membrane is interrupted: ectoderm and mesoderm appear intermingled, and this zone contains cells showing signs of epithelial-mesenchymal transition (Fig. 6e). The cellular architecture of the cone investing the neurenteric canal, therefore, represents signs of cellular involution in its cranial and lateral parts, but not in its caudal part, thereby giving the HINC as a region of involution surrounding the neurenteric canal cranio-laterally a horseshoe-like shape. Interestingly, the neuroectodermal epithelium in the right node shoulder (or

**Fig. 5.** Human stage 9 embryo (specimen name “Da1”). **a** Dorsal view of a reconstruction in Ludwig [1928] displaying notochord, primitive streak, cut edge of the amnion, proximal parts of the yolk sac, and dorsal opening of the neurenteric canal. **B, C,** and **D** indicate the position of transverse sections (images scanned from figures printed in Ludwig [1928] and shown in **b–d** at low (**b**) and high (**c, d**) magnification (section numbers are taken from Ludwig [1928] and indicated at the bottom left). Black asterisks mark the border of the embryonic disc. **c** Transverse section cutting the

neurenteric canal longitudinally and thus containing both the dorsal opening (black arrow) and the ventral opening (black arrowhead) of the neurenteric canal. Black circle with line attached marks the hinge of involuting notochord cells in the lateral wall of the neurenteric canal. **d** Transverse section through primitive streak forming the caudal wall of the neurenteric canal. **e** Dorso-caudal view of a “narrow” 3D reconstruction indicating the dorsal opening of the neurenteric canal. Scale bar: **a**  $750 \mu\text{m}$ . **b**  $300 \mu\text{m}$ . **c, d**  $100 \mu\text{m}$ .

**Fig. 6.** *Callithrix* stage 8b embryo (specimen No. GM79.01). **a** Stereomicroscopic dorsal view showing neural plate bulging bilaterally of notochordal process which widens caudally to encompass the dorsal neurenteric canal opening in the primitive node at the junction with the primitive streak (out of focus plane). Cut edge of the yolk sac is seen ventral and lateral to the anterior part of the neural plate. B, C, D, and E indicate the position of the transverse paraffin sections shown in **b–e** (section numbers indicated at the bottom left). **b–e** Transverse sections through the posterior broad part of the notochordal plate (**b**), through the cranial rim of the primitive node (or wall of dorsal neurenteric canal opening) showing lateral asymmetry (**c**), through the centre of the neurenteric canal (transverse arrow and arrowhead marking the dorsal opening and cellular debris within the ventral opening, respectively) with the hinge of involuting notochord cells (HINC; black circle with line attached) in its lateral wall (**d**), and through the cranial part of the primitive streak (**e**). **f** Dorsocaudal view of a “narrow” 3D reconstruction displaying the patent lumen of the neurenteric canal. **g** Enlargement of the semitransparent version of the 3D reconstruction shown in **f** and displaying cranial and medial margins of the basement membrane (green) separating the neuroectoderm and notochordal plate. Curved yellow arrows mark the involution of notochordal cells within the HINC, straight yellow arrow marks the ingression primitive streak mesoderm into the caudal wall of the neurenteric canal. Scale bar: **a** 800  $\mu\text{m}$ . **b–e** 50  $\mu\text{m}$ .



HINC) is slightly higher, and its cellular nuclei are more often round than oval and more often form more layers than in the left node shoulder (or HINC; Fig. 6c, d).

When 3DRs of the primitive node area are tilted and viewed from posterior, the neurenteric canal in the centre of the node is seen to be patent (Fig. 6f). The openings of the almost perpendicular neurenteric canal are connected by small oblique furrows oriented to the anterior left in the dorsal and ventral epithelium for a short distance (Fig. 6f). The right node shoulder is broader than the left and presents itself with a laterally shifted basement membrane forming an oblique oval area composed of ectoderm only (Fig. 6g). The right node shoulder is bent along the circumference of the canal and continues to be the cranial part of the primitive node from which the notochordal plate emerges. Cranial to this elevated part of the primitive node, the embryonic disc shows a broad flat stretch containing the notochordal plate and the floor plate both of which become narrow towards their cranial end (Fig. 6f). Laterally, the embryonic disc is folded and consists of ectoderm, mesoderm, and hypoblast cells as it does in the caudal part, where the lack of a basement membrane in the median plane indicates the position of the primitive streak.

In the stage 9 *Callithrix* embryo (specimen No. GP09.01), the embryonic disc measures  $2.1 \times 1.2$  mm and is, therefore, slightly larger than the embryonic disc of the stage 8b embryo (GM79.01); the first pair of somites is visible in the paraxial mesoderm under a pear-shaped, flat neural plate, and extraembryonic structures are principally similar to the ones seen in the stage 8b *Callithrix* embryo. The primitive node marks the junction between the primitive streak and a broad notochordal plate as at stage 8a (Fig. 7a), but it rises higher above the neural plate than at stage 8b (not shown) and presents in its centre – in the stereomicroscope and already at low magnification (Fig. 7a) – an oblique canal running from the dorsal caudal right to the ventral cranial left (see below). Transverse histological (paraffin) sections confirm this to be an oval neurenteric canal (20  $\mu$ m long and 13  $\mu$ m wide) connecting the yolk sac cavity with the amniotic cavity. As before, the canal lumen is surrounded by an epithelial cone consisting of notochordal plate (Fig. 7d) and primitive streak epiblast (Fig. 7e). The cellular architecture within this cone part of the notochordal plate varies along the cranio-caudal axis. Immediately cranial to the neurenteric canal, cells are cuboidal to low columnar with the nuclei positioned towards the basement membrane (Fig. 7b, c), whereas lateral to the neurenteric canal lumen the epithelium is high columnar, and nuclei are positioned in a

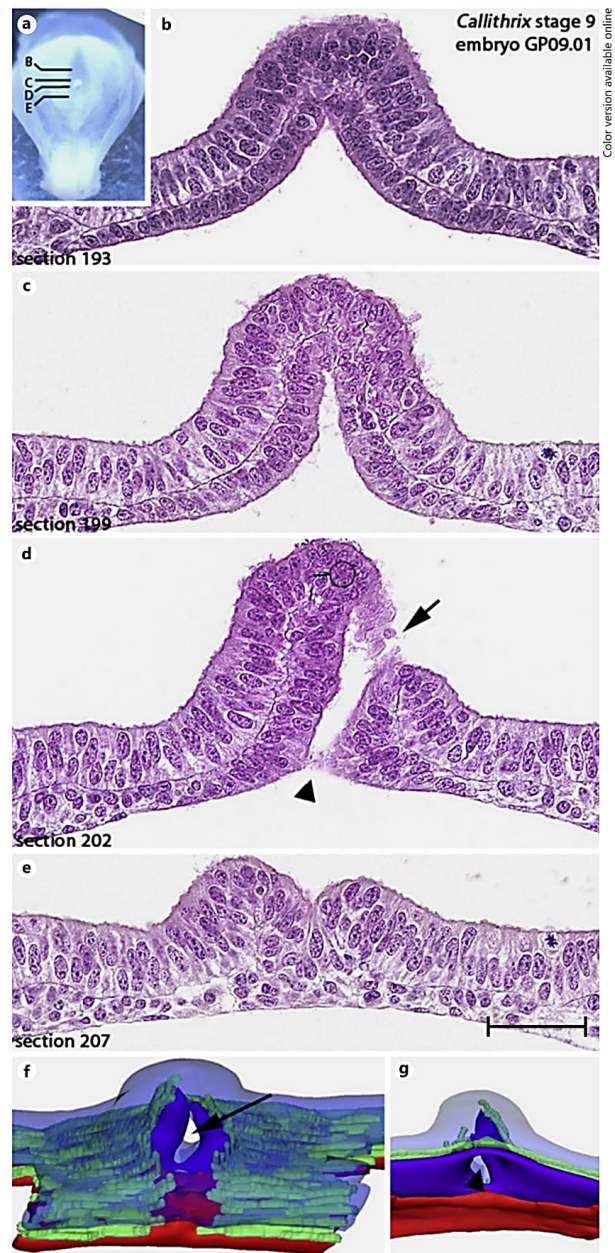
more irregular fashion (Fig. 7d). Cranial to the neurenteric canal lumen, the neuroectodermal epithelium in the right node shoulder is higher than on the left side (Fig. 7b). Directly caudal to this thickening, the basement membrane on the right side is lacking from the top of the node to its lower third (Fig. 7c). In addition, the cell nuclei within the right node shoulder are almost all round and form up to 5 layers. The nearby area of the primitive streak consists of epiblast, mesoderm, and hypoblast, the first two being intermingled and lacking a medial basement membrane border in the median plane. 3DR visualization confirms the oblique course of the neurenteric canal running from caudodorsal-right to cranioventral-left and being surrounded by epithelial cells. The ventral part of the cone is seen to consist of notochordal cells only (Fig. 7g). Furthermore, in the left node shoulder, the basement membrane rises high towards the dorsal surface (Fig. 7f) which is in contrast to the lack of a basement membrane in the right node shoulder (Fig. 7g).

#### *Asymmetric Nodal Expression in the Stage 8b Callithrix Embryo (Specimen No. GM79.01)*

Besides the morphological asymmetry described above in this embryo (Fig. 6) and using a *Callithrix nodal* cRNA probe, WISH revealed *nodal* expression in the left paraxial mesoderm next to the developing notochordal plate, immediately cranial to the dorsal opening of the neurenteric canal (Fig. 8a); the expression is found in 20 transverse sections further cranially resulting in an expression domain length of 140  $\mu$ m (Fig. 8a, b). The expression domain ends caudally where the basement membrane of the floor plate shows first discontinuities and forms the horseshoe-shaped HINC in the cranio-lateral circumference of the primitive node. Although a slight staining reaction on the right side is visible in some sections, this was not strong enough for the purpose of visualizing the asymmetry of the *nodal* expression domains in the 3DR. Thus, 3DR shows the *nodal* domain on the left only, and there is an intimate connection of it with the notochordal plate epithelium (Fig. 8c).

## Discussion

Our integrated analysis of modern and historic, human and non-human primate, histological and 3D-reconstructed specimens leads to the unambiguous identification of the neurenteric canal. The cellular components of its wall structures are consistently found in the Hensen's node area and in the axial mesoderm extending



**Fig. 7.** *Callithrix* stage 9 embryo (specimen No. GP09.01). **a** Stereomicroscopic dorsal view centring on the primitive node at the junction between the broad caudal extremity of the notochordal plate and primitive node. Note dorsal to the neural plate the cut edge of the amnion and caudally the density of the allantois and body stalk, lateral to which is the proximal part of the yolk sac. B–E indicate the position of the transverse Technovit® sections shown in **b–e** (section numbers indicated at the bottom left). **b–e** Sections through the cranial part of the ventral neurenteric canal opening consisting of cuboidal notochordal epithelium (**b**), through the cranial wall of the neurenteric canal with lateral asymmetry (**c**), through the centre of the neurenteric canal (arrow and arrowhead marking the cranial part of the dorsal opening wall and the caudal part of the ventral opening wall, respectively) with the hinge of involuting notochord cells (black circle with line attached) in its lateral wall (**d**), and through the cranial part of the primitive streak forming the caudal wall of the ventral neurenteric canal opening (**e**). **f** Dorsocaudal view of a semitranslucent version of a “narrow” 3D reconstruction displaying the patent lumen of the neurenteric canal (arrow marking the dorsal opening of the neurenteric canal). Colour coding as in Figure 9g. **g** Ventrocranial view of a “narrow” semitranslucent 3D reconstruction (arrowhead marking the ventral opening of the neurenteric canal). Scale bar: **a** 1 mm. **b–e** 50  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Asymmetric *nodal* expression in a *Callithrix* stage 8b embryo (specimen No. GM79.01). **a** Stereomicroscopic caudodorsal view centering on the primitive node containing the dorsal opening of the neurenteric canal. Arrow marks left *nodal* expression at the lateral border of the broad posterior part of the notochordal plate. **b** Transverse section (number indicated at the bottom left) through the centre of the *nodal* domain (arrow) in parachordal

cells and basal parts of overlying neuroectodermal cells at the left margin of the notochordal plate. Note weak colour reaction in parachordal cells and overlying neuroectodermal cells at the right notochordal plate margin. **c** Caudodorsal view of semitranslucent “narrow” 3D reconstruction. Colour coding similar to Figure 9 except for *nodal* domain (dark green). Scale bar: **a** 220  $\mu\text{m}$ . **b** 100  $\mu\text{m}$ . **c** 180  $\mu\text{m}$ .

from it in late pre-somite (Carnegie stage 8) and early somite stage (Carnegie stage 9) human embryos and this is schematically represented in Fig. 9c. At early and late stages 8 the cellular components of the near-midline neuroectoderm, axial mesoderm, and primitive streak determine the size of the (newly defined) radially expanding HINC in Hensen’s node to form the notochordal canal as a forerunner structure to the neurenteric canal (schematically represented in Fig. 9a, b). The SCM has a central position in the transition from notochordal canal to neurenteric canal and its analysis may now form the basis for finding mechanisms of neurenteric canal formation and for inborn pathologies of axial structures seen in the newborn and in early childhood.

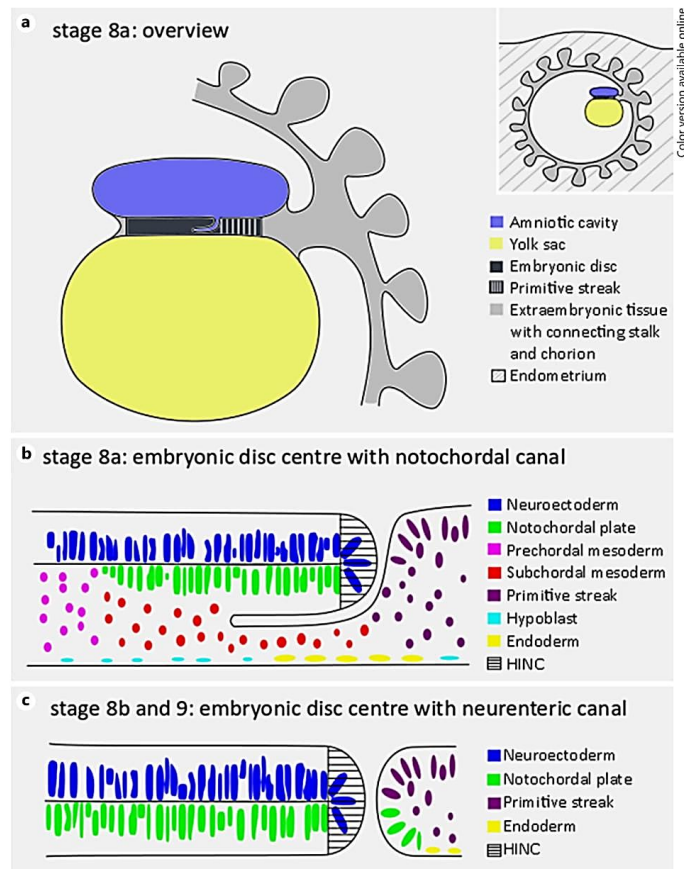
#### *Distinction of Neurenteric and Notochordal Canals and the Evolution of Amniote Gastrulation*

The histological findings and high-resolution 3DRs of the stage 8b and the stage 9 *C. jacchus* embryos presented here were crucial in identifying the cellular architecture of the notochordal canal and the neurenteric canal in the human embryo of equivalent stages. Applying this histological information to the published data on the few relevant human specimens available worldwide leaves little doubt about the neurenteric canal being a regular but

short-lived feature in the human. It is formed at the late stage 8 by local dissolution of the SCM and then shows transient patency at the early stage 9. The ventrally oriented funnel-shape opening lined by a cone of epithelial cells can now be recognized by the arrangement of nuclei near the ventral opening also in badly fixed specimens such as embryo Gle [von Spee, 1889], Peh.1 [Rossenbeck, 1923], and R.S. [Odgers, 1941] for late stage 8 or embryo H3 [Wilson, 1914] for stage 9, respectively. The fact that the new excellently preserved human early-stage-8 embryo presented here had been sectioned sagittally offered the rare chance, in addition, to verify the features of a hinge-like involution present in the 2 sagittally sectioned human stage 8 embryos of which median notochord histology had been published previously: in embryo CC8671 (Fig. 5) [Hertig, 1968; Fig. 106] and in embryo CC7972 [Müller and O’Rahilly, 2003, Fig. 4; cf. O’Rahilly and Müller, 1987, Appendix I].

High-resolution histological analysis complemented with 3DR applied to 3 consecutive stages (stages 8a, 8b, and 9) reinforced, then, the classical distinction between the notochordal and the neurenteric canal [Grosser, 1924] and the formation of the latter from the former [O’Rahilly and Müller, 1987] by dissolution of the SCM, which forms the ventral wall of the notochordal canal at

**Fig. 9.** Schematic drawing of median sagittal sections illustrating the topography of the notochordal canal and the neurenteric canal in the human embryo. **a** Overview at stage 8a with the amniotic cavity (light blue), yolk sac (light yellow), embryonic disc (black), and extraembryonic mesoderm, body stalk, and chorion (grey) as placed in the endometrium (inset) as part of the interstitial implantation of the conceptus. The notochordal canal has a dorsal connection to the amniotic cavity, only. **b** Detailed view at stage 8a illustrating the cellular composition of the notochordal canal wall and adjacent tissues. Coloured shapes represent cellular nuclei (see colour coding legend). **c** Detailed view of stage 8b illustrating the cellular composition of the neurenteric canal wall and adjacent tissues. Colour coding as in **b**. Note notochordal plate cells surrounding the ventral opening of the neurenteric canal. HINC, hinge of involuting notochord cells.



its caudal-most part immediately cranial to the primitive node. The definition of the notochordal plate as an epithelial part of the axial mesoderm presented here is more encompassing than the original description of the notochordal plate given by O’Rahilly and Müller [1981] who saw the notochordal plate confined to the central part of the developing notochord transiently intercalated into the endoderm and thereby exposed to the yolk sac cavity. In the light of previous descriptions provided by Selenka [1900] on the mangabey and gibbon, which are in accordance with studies on baboon and macaque embryos [Hendrickx, 1971; Heuser and Streeter, 1941;

Tamarin, 1983] where the dorsal opening of a possible neurenteric canal is documented, the cranial and cranio-lateral walls of the dorsal opening of the notochordal (and later neurenteric) canal are now defined as the horseshoe-shaped HINC and a universal characteristic of primate and reptile embryogenesis. Considering early morphological studies [Kowalevsky, 1877; Hoffmann, 1883; van Beneden, 1888], it seems justified to renew and refine the hypothesis that the mammalian neurenteric canal – together with the cranially adjacent HINC within the Hensen node – is homologous to the blastopore as a whole in reptiles and to the dorsal segment of



the blastopore with its adjacent blastoporal lips in amphibia: both the neurenteric canal and the blastopore are in their cranial part associated with an involution-type cell movement for the formation of the notochordal plate, and this shows striking parallels in primates [this study], bats [van Beneden, 1888], reptiles [Bertocchini et al., 2013; Stower and Bertocchini, 2017], amphibia [Shook and Keller, 2008], and in a number of bird species (including the chick: Charrier et al. [1999]; Tsikolia et al. [2012]), some of which may also have a notochordal canal (“rudimentary Urdarm”) or even a true neurenteric canal [Schauinsland, 1903]; in the chick, however, a neurenteric canal next to the HINC-like cellular arrangement within the primitive node [Tsikolia et al., 2012] has not yet been reported. The primitive streak itself would, hence, represent a homologue of the lateral and ventral parts of the blastopore as described before (see Hertwig [1906] and references therein). Intriguingly, reptiles – and possibly some rare avian species [cf. Schauinsland, 1903] – may thus be suitable to serve as a new model organism for notochord development and neurulation (see below) in primates, in particular. Finally, the primarily asymmetrical *nodal* expression in the stage 8 *Callithrix* embryo together with morphological asymmetries in the node suggests that primates make use of an early non-cilium-dependent left-right symmetry breaking mode similar to the situation in the chick, pig, and cattle [Schröder et al., 2016].

Intriguingly, the SCM seems to play a transient structural role in 2 processes central to gastrulation which have hitherto not been described to be functionally related: In many amniotes, the SCM covers up the potentially cilium-carrying apical surface of the notochord at the phase when the axial mesoderm forms a barrier to maintain early molecular left-right asymmetry [Blum et al., 2014; Schröder et al., 2016], and in primates the SCM seems to be centrally positioned for the formation of the neurenteric canal, which is, in turn, a central structure of the axial mesoderm. Experimental comparative analysis of the mechanism involved in origin, fate, and molecular characteristics of the SCM in the chick, mouse, and pig, for example, seems now to be a rewarding enterprise to clarify several processes central to gastrulation, neurulation, and establishing the amniote body plan.

#### *The Neurenteric Canal and Embryonic Malformations*

A proper spatial understanding of the formation of the neurenteric canal is also important when considering its possible role in congenital malformations because the neurenteric canal is located at the transition from

primary to secondary neurulation albeit as a temporary connection only between the amniotic cavity and primitive gut: The area undergoing secondary neurulation posterior to the neurenteric canal has to fuse with the neural tube and the notochord formed during primary neurulation. The persistent neurenteric canal may cause defects in this fusion which has been recently described as defects of the so-called junctional neurulation [Dady et al., 2014; Eibach et al., 2017; Schmidt et al., 2017; Florea et al., 2018]. Furthermore, the neurenteric canal may allow the migration of multipotent endodermal cells producing neuroendodermal cysts (or neurenteric cysts in the old nomenclature of de Oliveira et al. [2005]) along the entire neuroaxis including the supratentorial space (the cavity cranial to the cerebellum) in infants and middle-aged adults [Mittal et al., 2010]. These cysts can grow enormously in a short time [Priamo et al., 2011], causing neurological symptoms such as paraplegia [Rizk et al., 2001] and the need for neurosurgical intervention with close diagnostic follow-up by magnetic resonance imaging [Yang et al., 2015]. The neurenteric canal has also been suggested to be involved in the development of rare but severe abnormalities summarized as the split notochord syndrome which includes dorsal enteric fistula, a split vertebral column, and intestinal alterations [Bentley and Smith, 1960; Holschneider and Fendel, 1971; Singh and Singh, 1982; Gupta and Deodhar, 1987; Dhawan et al., 2017]. The thoracolumbar transition zone as the level where these deformities occur corresponds to the area impaired should a neurenteric canal persist beyond stage 10, and, indeed, experimental studies using the newt *Cynopus pyrrhogaster* proved that the split notochord syndrome can be mechanically induced here [Emura et al., 2000, 2003]. The level of the deformities observed also played a role in the dismissal [Hueston, 1953] of the suggestion that a sacrococcygeal fistula (also called pilonidal sinus) may originate from the persistent neurenteric canal [Kallet, 1940]: a pilonidal sinus arises principally at the sacrococcygeal level and, apart from this, does not involve intestinal tissue. A more likely hypothesis is, therefore, that pilonidal sinuses originate from the caudal part of the neural cord, which forms by secondary neurulation [cf. O’Rahilly and Mueller, 2001]. Further research, especially a high-resolution histological re-examination of at least all 31 remaining human stage 8 and 9 embryos of the Carnegie Collection [O’Rahilly and Müller, 1987; Appendix I] and of selected new pre-somite *Callithrix* embryos, may now substantiate these concepts and, some day, help the understanding of the molecular pathways leading to these malformations.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Kirsten Falk-Stietenroth, Hannes Sydow, Heike Faust, and Irmgard Weiss for their technical assistance, Dr. Henny van Straaten (Maastricht), pioneer in experimental studies of the chick notochord, for valuable discussions and his help in assembling and annotating a complete list of published human embryos with signs of a neurenteric canal, Dr. Peter

Giere (Berlin) for his support in photographing the embryo Dobbin, John Cork, Ph.D and Raymond F. Gasser, PhD (New Orleans) for the images of the embryo CC10157, Dr. Katharina Debowski (Göttingen) for supplying the *Callithrix nodal* probe, Angelina Berenson and Nicole Umland for assistance in animal work, Dr. Matthias Ochs (Berlin) and Dr. Wolfgang Knabe (Münster) for valuable discussions on 3DR issues.

### References

- Aeckerle, N., C. Drummer, K. Debowski, C. Viebahn, R. Behr (2015) Primordial germ cell development in the marmoset monkey as revealed by pluripotency factor expression: suggestion of a novel model of embryonic germ cell translocation. *Mol Hum Reprod* 21: 66–80.
- Arendt, D., K. Nübler-Jung (1999) Rearranging gastrulation in the name of yolk. Evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. *Mech Dev* 81: 3–22.
- Bancroft, J.D., C. Layton (2013) The hematoxylin and eosin; in Suvarna, S.K., C. Layton, J.D. Bancroft (eds): *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone Elsevier.
- Beck, C.W., J.M.W. Slack (1998) Analysis of the developing *Xenopus* tail bud reveals separate phases of gene expression during determination and outgrowth. *Mech Dev* 72: 41–52.
- Bentley, J.F.R., J.R. Smith (1960) Developmental posterior enteric remnants and spinal malformations: the split notochord syndrome. *Arch Dis Child* 35: 76–86.
- Bertocchini, F., C. Alev, Y. Nakaya, G. Sheng (2013) A little winning streak: the reptilian-eye view of gastrulation in birds. *Dev Growth Differ* 55: 52–59.
- Blum, M., A. Schweickert, P. Vick, C.V.E. Wright, M.V. Danilchik (2014) Symmetry breakage in the vertebrate embryo. When does it happen and how does it work? *Dev Biol* 393: 109–123.
- Boroviak, T., R. Loos, P. Lombard, J. Okahara, R. Behr, E. Sasaki, et al. (2015) Lineage-specific profiling delineates the emergence and progression of naive pluripotency in mammalian embryogenesis. *Dev Cell* 35: 366–382.
- Cambay, N., V. Wilson (2002) Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordeuronal hinge. *Development* 129: 4855–4866.
- Charrier, J.-B., M.-A. Teillet, F. Lapointe, N.M. Le Douarin (1999) Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development* 126: 4771–4783.
- Cork, J.R., R.F. Gasser (2017a) Virtual human embryo project. [http://virtualhumanembryo.lshsc.edu/downloads/DREM\\_disks.html](http://virtualhumanembryo.lshsc.edu/downloads/DREM_disks.html) (accessed October 2018).
- Cork, J.R., R.F. Gasser (2017b) Introduction – virtual human embryo project. [http://virtualhumanembryo.lshsc.edu/demos/Stage8\\_v2/Intro\\_pg/Intro.htm](http://virtualhumanembryo.lshsc.edu/demos/Stage8_v2/Intro_pg/Intro.htm) (accessed October 2018).
- Cork, J.R., R.F. Gasser (2017c) Browse sections – virtual human embryo project. [http://virtualhumanembryo.lshsc.edu/demos/Stage8\\_v2/Brws\\_pg/Disp\\_FS.htm](http://virtualhumanembryo.lshsc.edu/demos/Stage8_v2/Brws_pg/Disp_FS.htm) (accessed October 2018).
- Dady, A., E. Havis, V. Escriou, M. Catala, J.-L. Duband (2014) Junctional neurulation. A unique developmental program shaping a discrete region of the spinal cord highly susceptible to neural tube defects. *J Neurosci* 34: 13208–13221.
- de Bakker, B.S., K.H. de Jong, J. Hagoort, K. de Bree, C.T. Besselink, F.E.C. de Kanter, et al. (2016) An interactive three-dimensional digital atlas and quantitative database of human development. *Science* 354: aag0053.
- de Oliveira, R.S., G. Cinalli, T. Roujeau, C. Sainte-Rose, A. Pierre-Kahn, M. Zerah (2005) Neur-enteric cysts in children: 16 consecutive cases and review of the literature. *J Neurosurg* 103: 512–523.
- Debowski, K., C. Drummer, J. Lentens, M. Cors, R. Dressel, T. Lingner, et al. (2016) The transcriptomes of novel marmoset monkey embryonic stem cell lines reflect distinct genomic features. *Sci Rep* 6: 29122.
- Dhawan, V., K. Kapoor, B. Singh, S. Kochhar, A. Sehgal, R. Dada (2017) Split notochord syndrome. A rare variant. *J Pediatr Neurosci* 12: 177–179.
- Eibach, S., G. Moes, Y.J. Hou, J. Zovickian, D. Pang (2017) Unjoined primary and secondary neural tubes: junctional neural tube defect, a new form of spinal dysraphism caused by disturbance of junctional neurulation. *Childs Nerv Syst* 33: 1633–1647.
- Emura, T., M. Asashima, K. Hashizume (2000) An experimental animal model of split cord malformation. *Pediatr Neurosurg* 33: 283–292.
- Emura, T., K. Hashizume, M. Asashima (2003) Experimental study of the embryogenesis of gastrointestinal duplication and enteric cyst. *Pediatr Surg Int* 19: 147–151.
- Eternod, A. C.F. (1899) Il y a un canal notochordal dans l'embryon humain. *Anat Anz* 16: 131–143.
- Florea, S.M., A. Faure, H. Brunel, N. Girard, D. Scavarda (2018) A case of junctional neural tube defect associated with a lipoma of the filum terminale: a new subtype of junctional neural tube defect? *J Neurosurg Pediatr* 21: 601–605.
- Gihl, M. (1961) Methode zur Rekonstruktion von Nervenzellen. *J Hirnforsch* 5: 7–22.
- Gilbert, S.F., M.J.F. Barresi (2016) *Developmental Biology*, ed 11. Sunderland, Sinauer Associates Inc.
- Gont, L.K., H. Steinbeisser, B. Blumberg, E.M. de Robertis (1993) Tail formation as a continuation of gastrulation. The multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119: 991.
- Greenough, T.C., A. Carville, J. Coderre, M. Somasundaran, J.L. Sullivan, K. Luzuriaga, K. Mansfield (2005) Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Am J Pathol* 167: 455–463.
- Grosser, O. (1924) Junge menschliche Embryonen (der dritten und vierten Woche). *Erg Anat Entw Gesch* 25: 390–447.
- Gupta, D.K., M.C. Deodhar (1987) Split notochord syndrome presenting with meningo-myelocoele and dorsal enteric fistula. *J Pediatr Surg* 22: 382–383.
- Haeckel, E. (1874) *Die Gastraea-Theorie, die Phylogenetische Classification des Tierreichs und die Homologie der Keimblätter*. Jena Z Naturw 8: 1–55.
- Hendrickx, A.G. (1971) *Embryology of the Baboon*. Chicago, University of Chicago Press.
- Hensen, V. (1876) *Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens*. *Z Anat Entwickl Gesch* 1: 213–273, 353–423.
- Hertig, G. (1968) *Human Trophoblast*. Springfield, Ill., Thomas.
- Hertig, G., H. Gore (1966) *The female genitalia. Placenta, Amnion and Umbilical Cord*; in Anderson, W.A.D.: *Pathology*, ed 5. St. Louis, Mosby.
- Hertwig, O. (1906) *Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Wirbeltiere*, Band 1, Teil 1, pp 699–966. Jena, Fischer.

- Heuser, C.H. (1932) A presomite human embryo with a definite chorda canal. *Contrib Embryol* 23: 251–267.
- Heuser, C.H., G.L. Streeter (1941) Development of the macaque embryo. *Contrib Embryol* 29: 15.
- Hill, J.P., J. Florian (1931) A young human embryo (embryo Dobbin) with head-process and prochordal plate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 219: 443–486.
- Hoffmann, C.K. (1883) Zur Ontogenie der Knochenfische. *Arch Mikrosk Anat* 23: 45–108.
- Holschneider, A.M., H. Fendel (1971) Beitrag zu Wirbelsäulenfehlbildungen in Kombination mit intestinalen und urogenitalen Missbildungen. *Z Kinderchir* 10: 230–238.
- Hueston, J.T. (1953) The aetiology of pilonidal sinuses. *Br J Surg* 41: 307–311.
- Kallet, H.I. (1940) Pilonidal sinus. *Am J Surg* 50: 648–652.
- Kowalevsky, A. (1877) Weitere Studien über die Entwicklungsgeschichte des *Amphioxus lanceolatus*, nebst einem Beitrage zur Homologie des Nervensystems der Würmer und Wirbelthiere. *Arch Mikrosk Anat* 13: 181–204.
- Leibovitch, E., J.E. Wohler, M. Cummings, M. Sheila, K. Motanic, E. Harberts, M.I. Gaitán, et al. (2013) Novel marmoset (*Callithrix jacchus*) model of human herpesvirus 6A and 6B infections. Immunologic, virologic and radiologic characterization. *PLoS Pathog* 9: e1003138.
- Lieberkühn, N. (1882) Über die Chorda bei Säugethieren. *Arch Anat Entw Gesch*, pp 399–438.
- Ludwig, E. (1928) Über einen operativ gewonnenen menschlichen Embryo mit einem Ursegmente. *Gegenbauers Morphol Jahrb* 59: 41–103.
- Mittal, S., K. Petrecca, A.J. Sabbagh, M. Rayes, D. Melançon, M.-C. Guiot, A. Olivier (2010) Supratentorial neurenteric cysts – a fascinating entity of uncertain embryopathogenesis. *Clin Neurol Neurosurg* 112: 89–97.
- Müller, F., R. O’Rahilly (2003) The prechordal plate, the rostral end of the notochord and nearby median features in staged human embryos. *Cells Tissues Organs* 173: 1–20.
- Müller, F., R. O’Rahilly (2004) The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos. *Cells Tissues Organs* 177: 2–20.
- Neuhauser, E.B.D., H.J. Kaufmann (1961) A.O. Kovalevski and the neurenteric canal. A note on some historical inaccuracies. *Proc R Soc Med* 54: 927–929.
- Ogders, P.N.B. (1941) A presomite human embryo with a neurenteric canal (embryo R.S.). *J Anat* 75: 381–388.3.
- O’Rahilly, R., F. Müller (1981) The first appearance of the human nervous system at stage 8. *Z Anat Entw Gesch* 163: 1–13.
- O’Rahilly, R., F. Müller (1987) Development Stages in Human Embryos. Washington, Carnegie Institution of Washington.
- O’Rahilly, R., F. Müller (2001) Human Embryology and Teratology. New York, Wiley-Liss.
- O’Rahilly, R., F. Müller (2006) The Embryonic Human Brain. An Atlas of Developmental Stages, ed 3. Hoboken, Wiley.
- Pasteels, J. (1943) Proliférations et croissance dans la gastrulation et la formation de la queue des vertébrés. *Arch Biol* 54: 1–51.
- Priamo, F.A.L., E.D. Jimenez, E.A. Benardete (2011) Posterior fossa neurenteric cysts can expand rapidly: case report. *Skull Base Rep* 1: 115–124.
- Püschel, B., A. Jouneau (2015) Whole-mount in situ hybridization to assess advancement of development and embryo morphology. *Methods Mol Biol* 1222: 255–265.
- Rizk, T., G.A. Lahoud, J. Maarrawi, R. Hourani, P. Jabbour, S. Koussa, N. Okais (2001) Acute paraplegia revealing an intraspinal neurenteric cyst in a child. *Childs Nerv Syst* 17: 754–757.
- Rossenbeck, H. (1923) Ein junges menschliches Ei. Ovum humanum Peh.1 - Hochstetter. *Z Anat Entwickl Gesch* 68: 325–385.
- Sander, I. (2001) Beschreibung eines menschlichen Embryos der dritten Woche; Thesis Medical Faculty, University of Göttingen.
- Sasaki, E., K. Hanazawa, R. Kurita, A. Akatsuka, T. Yoshizaki, H. Ishii, et al. (2005) Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 23: 1304–1313.
- Schaunsland, H.H. (1903) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Wirbeltiere. Stuttgart, Nägels.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676–682.
- Schmidt, C., V. Voin, J. Iwanaga, F. Alonso, R.J. Oskouian, N. Topale, et al. (2017) Junctional neural tube defect in a newborn. Report of a fourth case. *Childs Nerv Syst* 33: 873–875.
- Schröder, S.S., N. Tsikolia, A. Weizbauer, I. Hue, C. Viebahn (2016) Paraxial nodal expression reveals a novel conserved structure of the left-right organizer in four mammalian species. *Cells Tissues Organs* 201: 77–87.
- Selenka, E. (1900) Studien über Entwicklungsgeschichte der Tiere. Wiesbaden, Kreidel.
- Shook, D.R., R. Keller (2008) Epithelial type, ingression, blastopore architecture and the evolution of chordate mesoderm morphogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 310: 85–110.
- Singh, A., R. Singh (1982) Split notochord syndrome with dorsal enteric fistula. *J Pediatr Surg* 17: 412–413.
- Sternberg, H. (1927) Beschreibung eines menschlichen Embryos mit vier Ursegmentpaaren. *Z Anat Entw Gesch* 82: 142–240.
- Stower, M.J., F. Bertocchini (2017) The evolution of amniote gastrulation. The blastopore-primitive streak transition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 6: e262.
- Strahl, H. (1916) Über einen jungen menschlichen Embryo nebst Bemerkungen zu C. Rabl’s Gastrulationstheorie. *Anat Hefte* 54: 13–147.
- Tamarin, A. (1983) Stage 9 macaque embryos studied by scanning electron microscopy. *J Anat* 137: 765.
- Thomson, J.A., J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C.P. Harris, J.P. Hearn (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55: 254–259.
- Tsikolia, N., S. Schröder, P. Schwartz, C. Viebahn (2012) Paraxial left-sided nodal expression and the start of left-right patterning in the early chick embryo. *Differentiation* 84: 380–391.
- van Beneden, É. (1888) Untersuchungen über die Blätterbildung, den Chordakanal und die Gastrulation bei den Säugetieren, Kaninchen und *Vespertilio murinus* betreffend. *Anat Anz* 3: 709–714.
- von Spee, F. (1889) Beobachtungen an einer menschlichen Keimscheibe mit offener Medullarlinie und Canalis neurentericus. *Arch Anat Physiol*, pp 159–176.
- Wilson, J.T. (1914) Observations upon young human embryos. *J Anat Physiol* 48: 315–351.
- Yang, T., L. Wu, J. Fang, C. Yang, X. Deng, Y. Xu (2015) Clinical presentation and surgical outcomes of intramedullary neurenteric cysts. *J Neurosurg Spine* 23: 99–110.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Christoph Viebahn für die exzellente Betreuung dieser Dissertationsschrift.

Weiterhin bedanke ich mich bei Kirsten Falk-Stietenroth, Hannes Sydow, Heike Faust und Irmgard Weiss für die technische Unterstützung; bei Dr. Peter Giere (Berlin) für die Hilfe beim Fotografieren des Embryos Dobbin; bei R. John Cork, Ph.D und Raymond F. Gasser, Ph.D. (New Orleans) für die Bereitstellung der Dateien zum Embryo CC10157; bei Bernadette de Bakker für die Bereitstellung der Dateien zum Embryo CC8671; bei Braah Harmoush für die wertvollen Diskussionen zur 3DR und bei Dr. med. Nikoloz Tsikolia für die vielfache Unterstützung.