

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

---

**Zur Rolle der Chorda dorsalis und der Funktion der Dyneine bei der  
molekularen Rechts-Links-Differenzierung des Säugers**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Silke Sabina Schröder**  
aus  
Bremen

Göttingen 2016

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht in:

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

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. med. Christoph Viebahn
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. rer. nat. Jörg Großhans
Drittreferent/in:	Prof. Dr. rer. nat. Ahmed Mansouri
Datum der mündlichen Prüfung:	27.06.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Zur Rolle der Chorda dorsalis und der Funktion der Dyneine bei der molekularen Rechts-Links-Differenzierung des Säuger“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Schreibweise.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Morphologie der Achsenentwicklung.....	1
1.2 Frühentwicklung der Chorda dorsalis.....	4
1.3 Die Chorda dorsalis in der Phylogenese.....	4
1.4 Gastrulations- und Neurulationsstadien verschiedener Amnioten.....	7
1.4.1 Huhn.....	8
1.4.2 Kaninchen.....	9
1.4.3 Schwein.....	10
1.4.4 Mensch.....	10
1.4.5 Maus.....	13
1.5 Rechts-Links-Differenzierung.....	15
1.5.1 Extrazelluläre Mechanismen.....	15
1.5.2 Intrazelluläre Mechanismen.....	18
1.5.3 Genetische Mutationen mit Bezug zur Rechts-Links-Differenzierung.....	19
1.5.4 Die Rolle axonemaler Dyneine in der Rechts-Links-Differenzierung.....	24
1.6 Fragestellung.....	25
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Laborgeräte.....	27
2.1.2 Mikroskopie.....	28
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	28
2.1.4 Allgemeine Laborchemikalien.....	29
2.1.5 Pharmakologische Substanzen.....	30
2.1.6 Substanzen für die Molekularbiologie (inkl. Primer).....	30
2.1.7 Substanzen für die PCR.....	30
2.1.8 Substanzen für die Bakteriologie.....	32
2.1.9 Primer für die Colony-PCR.....	32
2.1.10 Substanzen für den RNA-Sondenbau.....	32
2.1.11 Substanzen für die <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	32
2.1.12 Chemikalien für die Gelelektrophorese.....	33

2.1.13 Standardlösungen .....	33
2.1.14 Nährmedien und Zusätze .....	33
2.1.15 Lösungen für die <i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	34
2.1.16 Materialien für die histologische Aufbereitung.....	36
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Gewinnung von Embryonen und Gewebepräparation.....	37
2.2.2 Histologie .....	37
2.2.3 Herstellung von RNA-Sonden.....	38
2.2.4 <i>In-situ</i> -Hybridisierung an ganzen Keimscheiben .....	43
2.2.5 Technovit-Einbettung.....	46
2.2.6 Fotografie .....	47
3 ERGEBNISSE .....	48
3.1 Vergleichende Strukturentwicklung der frühen Chorda dorsalis .....	48
3.1.1 Chronologie und grundlegende strukturelle Merkmale der Chorda dorsalis .....	48
3.1.2 Stadienbezogene Strukturmerkmale im interspezifischen Vergleich .....	51
3.2 Dyneinexpression im Kaninchen Stadium 4-7 .....	65
3.2.1 cDNA-Sequenzen.....	65
3.2.2 Expressionsmuster .....	66
4 DISKUSSION .....	76
4.1 Methodisches.....	76
4.2 Vergleichende Morphologie .....	79
4.3 Dyneinexpression .....	83
4.4 Die Chorda dorsalis als Achsenstruktur und Signalzentrum .....	85
4.5 Mögliche gemeinsame Mechanismen der Rechts-Links-Differenzierung.....	86
5 Zusammenfassung.....	88
6 Anhang.....	89
7 Literaturverzeichnis .....	93

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Kaninchenkeimscheiben der Stadien 4-7.....	3
Abbildung 2: Medianer Sagittalschnitt eines Hühnerembryos Stadium 5.....	51
Abbildung 3: Sagittalschnitt eines Schweineembryos im Stadium 5 .....	52
Abbildung 4: Sagittalschnitt eines Kaninchenembryos Stadium 5.....	53
Abbildung 5: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos im Stadium 5 .....	54
Abbildung 6: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos Stadium 5 .....	55
Abbildung 7: Sagittalschnitt eines Schweineembryos im Stadium 6. ....	56
Abbildung 9: Sagittalschnitt eines Kaninchenembryos Stadium 6.....	58
Abbildung 8: Transversalschnitt eines Schweineembryos im Stadium 6.....	57
Abbildung 10: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos im Stadium 6 .....	59
Abbildung 11: Sagittalschnitt eines menschlichen Embryos des Carnegie-Stadiums 8.....	60
Abbildung 12: Sagittalschnitt eines Mäuseembryos Stadium 6.....	61
Abbildung 13: Medianer Sagittalschnitt eines Hühnerembryos Stadium 7.....	62
Abbildung 14: Medialer Sagittalschnitt eines Schweineembryos Stadium 7.....	63
Abbildung 15: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos des Stadiums 7 .....	64
Abbildung 16: Sagittalschnitt eines Mäuseembryos Stadium 7.....	64
Abbildung 17: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 4-Embryos nach ISH für Dynein 9 .....	66
Abbildung 18: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Embryos Stadium 5 nach ISH für Dynein 9. ....	67
Abbildung 19: Sagittalschnitt eines Embryos im Stadium 5 nach ISH für Dynein 9.....	67
Abbildung 20: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 6-Embryos nach ISH.....	68
Abbildung 21: Dunkel- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 7-Embryos nach ISH für Dynein 9. ....	69
Abbildung 22: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 4-Embryos nach ISH für Dynein 11. ....	69
Abbildung 23: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 5-Embryos nach ISH für Dynein 11.....	71
Abbildung 24: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 6-Embryos nach ISH für Dynein 11. ....	70
Abbildung 25: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 7-Embryos nach ISH für Dynein 11. ....	72
Abbildung 26: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 4-Embryos nach ISH für Dynein 5. ....	73
Abbildung 27: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 5-Embryos nach ISH für Dynein 5. ....	73
Abbildung 28: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 6-Embryos nach ISH für Dynein 5. ....	74

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der verschiedenen Spezies, der Entwicklungsmerkmale und der Zeitpunkte des Auftretens (Angaben Maus nach Downs und Davies 1993) ..... 8

Tabelle 2: Inkubationszeiten mit Proteinase K in Abhängigkeit von den Entwicklungsstadien.. 44

Tabelle 3: Darstellung der Entwicklung der Chorda dorsalis in Abhängigkeit von den Stadien unter Berücksichtigung der allgemeinen Stadieneinteilung (vgl. Tab. 1) ..... 79

## Abkürzungsverzeichnis

(W)ISH	<i>(whole mount) in-situ-hybridisation</i>
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	Bidestilliert
bp	Basenpaar
ca.	<i>Circa</i>
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAH	<i>dynein heavy chain</i>
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
dpc	<i>dies post conceptionem</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	<i>et cetera</i>
H	<i>hour, Stunde</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nm	Nanometer
PCD	<i>primary cilia dyskinesia</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pmol	pikomolar
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-galactosid



z.B.	zum Beispiel
------	--------------

## Abkürzung der Nucleotide

A Adenosin  
T Thymin

C Cytosin  
G Guanin

## Schreibweise

*Klein, kursiv (z.B. dnah5)*

Normal, klein (z.B. dnah5)

*KURSIV, GROSS (z.B. DNAH5)*

NORMAL GROSS (z.B. DNAH5)

Gen, DNA, RNA

Protein

humanes Gen, DNA, RNA

humanes Protein

## 1 EINLEITUNG

Obgleich im Laufe der Evolution unzählige verschiedene Formen von Wirbeltieren entstanden sind, so zeigen sie doch typischerweise einen annähernd symmetrischen Körperbau, mit einer in der Regel asymmetrischen Anlage vieler innerer Organe. Die Komplexität der Entwicklung eines Organismus aus einer einzigen Zelle hin zum asymmetrisch gebauten, vielzelligen Organismus ist noch nicht vollständig verstanden. Bereits früh wird die ventrale und dorsale Orientierung durch die Lage der Keimscheibe in der Blastozyste definiert, durch weitere Differenzierung werden die kranio-kaudale Achse und damit gleichzeitig auch die Orientierung in der Horizontalen festgelegt. Dabei ist die Keimscheibe zu Beginn weitgehend symmetrisch aufgebaut, es fehlen sichtbare, unilateral angelegte Signalzentren. Der sogenannte *Situs inversus*, eine seitenverkehrte Organanlage, ist jedoch ein zumindest bei Säugetieren verhältnismäßig seltenes Phänomen. Demzufolge beruht die seitenspezifische Organanlage auf einem festgelegten Entwicklungsschema. Die ersten Schritte zur Seitenspezifisierung müssen auf molekularer Ebene gelegt werden, um sich später morphologisch zu manifestieren. Für eine Trennung der beiden Körperseiten und als potentieller Induktor einer asymmetrischen Entwicklung bieten sich daher zentral gelegene, symmetrische, molekular definierte Areale an.

### 1.1 Morphologie der Achsenentwicklung

Während der Ontogenese zeigt sich ein breit gefächertes Spektrum an Körperformen und Entwicklungswegen, die bei verwandten Spezies sehr unterschiedlich verlaufen können. Gleichzeitig können bei sehr unterschiedlichen Tierarten jedoch auch ähnliche Mechanismen beobachtet werden (Duboule 1994). Die Mehrzahl der Amnioten, so auch das Kaninchen und das Hausschwein, bilden flache Keimscheiben, in denen die drei Keimblätter in der Regel gut voneinander abgegrenzt werden können. Diese Art Keimscheibe findet sich auch beim menschlichen Embryo (Muller und O'Rahilly 2003; O'Rahilly und Müller 1987a), Pferd (Walter et al. 2010) und beim Huhn (Manner 2001; Tsikolia et al. 2012). Erst bei fortschreitendem Wachstum kommt es zu einer Faltung des Embryos. Die genaue Morphologie und auch die spätere Entwicklung der einzelnen Spezies differieren wiederum stark (Duboule 1994). Die ventrale Schicht der Vogel- oder Säugerkeimscheibe ist der Hypoblast, der nicht direkt an der Bildung des Embryos

beteiligt ist, sondern später durch das definitive Entoderm ersetzt wird. Nach neueren Untersuchungen geht man davon aus, dass der Hypoblast einen wichtigen Faktor bei der Induktion der Entwicklung der Primitivrinne darstellt. Im posterioren Drittel des Embryos findet sich eine streifenförmige Zellverdichtung, die die Orientierung in der noch runden Keimscheibe sichtbar macht, der Primitivstreifen. Bei der Einwanderung von Epiblastzellen im Primitivstreifen entsteht eine Einsenkung, die so genannte Primitivrinne, aus den einwandernden Zellen entsteht das Mesoderm. Der sogenannte Spemann-Organisator, nach seinem Entdecker Hans Spemann benannt, ist eine Zellgruppe, die verantwortlich ist für die Festlegung der Achsen, die Entstehung der Chorda und die Gastrulationsbewegungen. Während dieser Organisator bei Amphibien in der dorsalen Urmundlippe zu suchen ist, findet er sich bei Amnioten, also bei den hier besprochenen Säugern und Vögeln, im Primitivknoten (Balinsky 1970; Moore et al. 2007). Die Bildung des Primitivstreifens verläuft bei Vögeln, Reptilien und Säugetieren vergleichbar. Am vorderen Ende des Primitivstreifens findet sich eine rundliche Zellverdichtung, der Primitivknoten. Der Primitivknoten oder Hensen'scher Knoten entspricht in etwa der dorsalen Urmundlippe der Amphibien, hier findet eine Einwanderung von Zellen statt, die im weiteren Verlauf das Material für die Chorda dorsalis liefern, aus ihnen soll durch Zellteilung und Migration die Chorda dorsalis entstehen (Bellomo et al. 1996). Bei Amphibien invaginiert bei der Gastrulation ein Teil des Gewebes als Massenbewegung an der so genannten Urmundlippe, so dass das Ektoderm außen verbleibt und sich ausbreitet, während Mesoderm und Entodermzellen nach innen gelangen (Campbell und Reece 2003). Beim Huhn dagegen immigrieren nur einzelne Zellen. Bei Vögeln, Reptilien und Säugetieren verläuft die Gastrulation generell etwas anders als bei Amphibien, die Primitivrinne ist hier das erste sichtbare Merkmal; sie entspricht in etwa den lateralen Urmundlippen des Frosches (Blum et al. 2007). In dieser Zone findet während der Gastrulation eine epidermal-mesenchymale Umwandlung statt, bei der das spätere Mesoderm als drittes Keimblatt invaginiert. Dem Transkriptionsfaktor *brachyury* wird dabei eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Wilkinson et al. 1990), ebenso bei der Differenzierung der Chorda und des Neuralrohrs (Schneider und Brueckner 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor scheint z.B. *nodal* zu sein, ein Wachstumsfaktor aus der TGF $\beta$ -Familie (Zhou et al. 1993; Blum et al. 2007; Blomberg et al. 2008; Lee und Anderson 2008; Blum et al. 2014b). Der Primitivstreifen endet später kranial am Primitivknoten, der im Stadium 4 sichtbar wird.

Im weiteren Verlauf der Gastrulation weicht der Primitivknoten nach kaudal zurück, während im vorderen Bereich die Chorda dorsalis an Länge gewinnt (Stadium 5). Währenddessen geht die Zellimmigration im Knoten und entlang des Primitivstreifens weiter. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits alle drei Keimblätter sichtbar. Der Epiblast bildet dorsal eine Epithelschicht die, durch eine Basalmembran getrennt, vom noch locker strukturierten Mesoderm unterlagert wird. Der Hypoblast ist ebenfalls mit einer Basalmembran abgegrenzt und bildet die ventrale Schicht des Embryos. Alle weiteren Strukturen sind nicht an der Bildung des Embryos beteiligt. Am kranialen Ende des Embryos beginnt etwa gleichzeitig mit der Bildung der Chorda die Verdrängung des Hypoblasten durch das Endoderm.

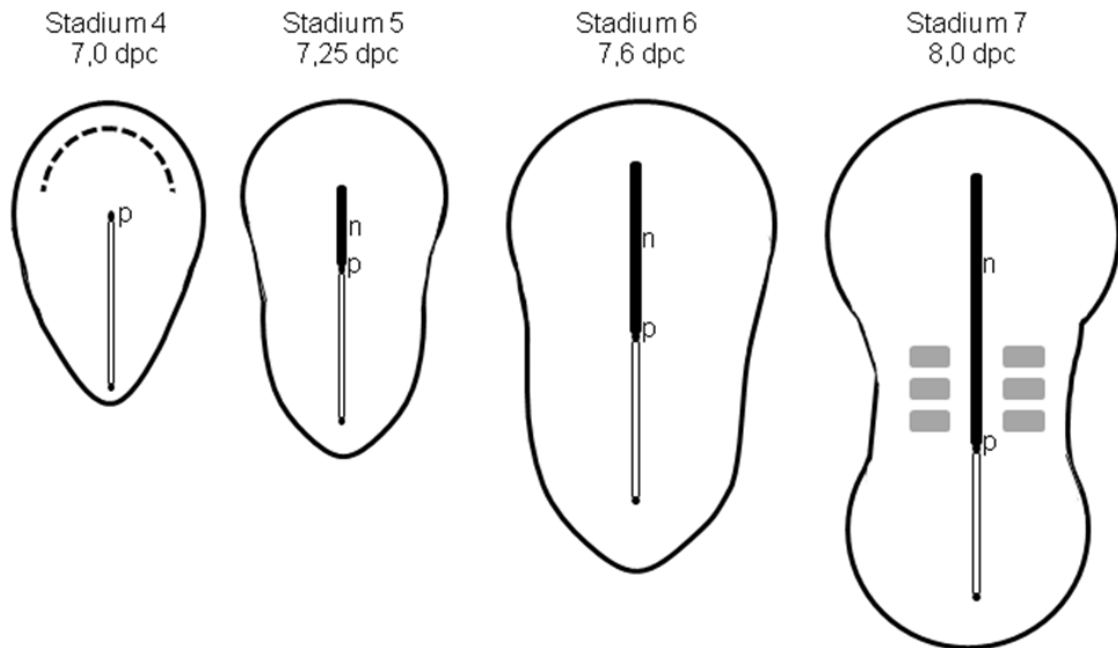


Abbildung 1: schematische Darstellung von Kaninchenkeimscheiben der Stadien 4-7.

Im Stadium 4 entwickelt sich der Primitivknoten (p), im Stadium 5 beginnt die Chorda dorsalis (n) in kraniale Richtung auszuwachsen. Der Embryo und damit auch die Chorda dorsalis gewinnt im Stadium 6 deutlich an Länge. Das Stadium 7 ist gekennzeichnet durch das Auftreten der ersten Somiten. Das durchschnittliche Entwicklungsalter im entsprechenden Stadium ist mit *dies post conceptionem* (dpc) unter den Stadien vermerkt. Abb. modifiziert nach Idkowiak (2007) (p. 5)

## 1.2 Frühentwicklung der Chorda dorsalis

Im Stadium 5 beginnt sich bei den Spezies, die in Analogie zu den Stadien nach Hamburger und Hamilton klassifiziert werden, die Chorda dorsalis kranial des Primitivknotens auszubilden und nach vorn zu verlängern. Dabei ist aber noch unklar, ob die Chorda noch vorn auswächst oder lediglich der Primitivknoten durch das Längenwachstum des gesamten Embryos nach hinten ausweicht und sich die Chorda dadurch verlängert. Definitionsgemäß ist die Chorda eines Embryos des Stadiums 5 noch kürzer als der Primitivstreifen, im Stadium 6 hingegen hat sie deutlich an Länge gewonnen. Auch der Embryo verändert dabei seine Form am kaudalen Ende, wobei der Primitivstreifen aber immer noch deutlich zu erkennen ist, obgleich er im Vergleich zur Gesamtlänge des Embryos an Länge eingebüßt hat. Im Stadium 7 imponiert die Chorda als deutlich sichtbare mediane Struktur, flankiert von ein bis drei Somitenpaaren. Da diese drei Stadien zeitlich sehr dicht aufeinander folgen, scheinen sich ab einer gewissen Chordalänge die Somiten recht schnell zu bilden. Die Somiten entwickeln sich aus Mesodermverdichtungen lateral der Chorda, später bilden sich in ihnen Hohlräume.

## 1.3 Die Chorda dorsalis in der Phylogenese

Der Begriff Chorda dorsalis wurde von K. E. v. Baer (1828) geprägt und als bedeutende Gemeinsamkeit aller Wirbeltiere erkannt. Er beschrieb sie als Rückensaite, um die herum sich die ersten Teile des Embryos bilden würden. Die Chordatiere gehören zusammen mit den *Echinodermata* (Stachelhäuter) und Hemichordaten zu den *Deuterostomia*. Sie teilen bereits einige wesentliche Merkmale in ihrer Embryonalentwicklung, so entwickelt sich bei ihnen allen ein Coelom und wie der Name „Neumünder“ anzeigt, bricht bei ihnen ein neuer Mund durch, während sich der Urmund zum After entwickelt. Die *Hemichordata* vereinigen die Merkmale der *Chordata* und *Echinodermata*, sind evolutionär aber schon lange getrennt. Es ist ein relativ kleiner Stamm, der nur wenige, marine Arten umfasst. Es scheint bereits eine Art Chorda zu existieren - als Blindsack des Vorderdarms- im Unterschied zu den *Chordata* endet der Darm allerdings an der Schwanzspitze. Die stammesgeschichtliche Einteilung der *Chordata* beinhaltet außer den Vertebraten noch die Unterstämme der *Tunicata* (Manteltiere) und *Acrania* (Lanzettfischchen, Schädellose) als Invertebraten ( Starck 1982; Campbell und Reece 2003; Wehner und Gehring 2013). Die als Chordaten zusammengefassten Tiere weisen als gemeinsames Merkmal die zumindest zeitweise

angelegte Chorda dorsalis auf, die auch als Notochord oder Rückensaite bezeichnet wird. Eine weitere Gemeinsamkeit ist das dorsale Nervensystem, bei dem sich die Neuralplatte dorsal zum Neuralrohr schließt. Außerdem findet sich ein sogenannter Kiemendarm, der entweder zur Nahrungsaufnahme dienen kann, oder, wie bei Fischen, der Atmungsfunktion. Das Herz liegt bei Chordaten ventral und eine segmentale Gliederung ist in einigen Organsystemen zu erkennen. In einigen Arbeiten wird auch ein sogenannter muskulöser, postnataler Schwanz als gemeinsames Merkmal der meisten Chordaten genannt. Das Besondere ist dabei die Lage des Schwanzes hinter dem After, während bei vielen Nicht-Chordaten der After am Schwanzende mündet (Ahne 2000; Campbell und Reece 2003). Die Vertebraten zeichnen sich durch eine Neuralleiste, die Wirbelsäule und ein geschlossenes Kreislaufsystem aus, zudem zeigen sie im Vergleich mit den übrigen Tierarten ein differenzierteres Nervensystem. Eine Ausnahme bilden die Schleimaale, die nicht über eine Wirbelsäule verfügen. Sie gehören zu den *Agnatha* (Kieferlosen), im Gegensatz zu den *Gnathostomata* (Kiefermäuler). Zu den *Gnathostomata* zählen wiederum die Fische und die Tetrapoden (Amphibien und Amnioten) (Campbell und Reece. 2003; Westheide 2005). Die Amnioten umfassen wiederum die Reptilien, Vögel und Säuger. Die Gemeinsamkeit besteht hier zunächst im amniotischen Ei, das erstmals eine Eiablage im Trockenen ermöglichte, während es sich beim Säuger im mütterlichen Uterus entwickelt, jedoch ist auch die frühe Embryonalentwicklung sehr ähnlich. Die Kloakentiere (*Monotremata*) sind als eierlegende Säugetiere die wohl ursprünglichste Form, gefolgt von den Beuteltieren (*Marsupialia*) (Campbell und Reece. 2003; Westheide 2005). Die *Placentalia*, also die Mehrzahl der Säugetiere, die außerhalb des australischen Kontinents heimisch sind, zeigen eine verhältnismäßig längere intrauterine Entwicklung (Starck 1982; Campbell und Reece 2003). Im Folgenden soll aber nur auf die Chorda bei höheren Wirbeltieren, insbesondere bei den Säugetieren, sowie vergleichend auf die Chorda des Huhns als Vertreter der Vögel näher eingegangen werden.

Bei niederen Wirbeltieren erfüllt die Chorda auch im adulten Tier eine Skelettfunktion und ist gut entwickelt, bei höheren Wirbeltieren ist sie dagegen nur embryonal angelegt und bildet sich im Laufe der Entwicklung weitgehend zurück (Weissenberg 1929; Jurand 1974; Moore et al. 2007). Reste bleiben zum Beispiel im Nucleus pulposus der Zwischenwirbelscheiben erhalten. Entarten erhalten gebliebene Chordazellen, so bilden

sie den Ursprung für sogenannte Chordome, eine meist gutartige, langsam wachsende Tumorart. Die wesentlich selteneren malignen Tumoren der Chorda wachsen aggressiver und infiltrieren zunächst den benachbarten Knochen. (Moore et al. 2007). Die Chorda spielt außerdem eine Rolle in der Entwicklung der knorpeligen Anteile der Wirbelsäule, dies garantiert außerdem einen räumlichen Bezug zum späteren Rückenmark (Bancroft und Bellairs 1976).

Anders als das definitive Rückenskelett der höheren Tiere besteht die Chorda nur aus Zellen, die häufig von einem fibrösen Material umgeben sind, während beim endgültigen Skelett die extrazelluläre Matrix dominiert. In der weiteren Entwicklung dient sie als Ankerpunkt für die sich entwickelnden Myomere (Moore et al. 2007).

Eine wichtige Aufgabe der Chorda scheint die Induktion der Neurulation, da sich das Neuralrohr direkt über der Chorda ausbildet (van Straaten et al. 1988; Smith und Schoenwolf 1989; Ybot-Gonzalez et al. 2002). Die Ausbildung der Neuralplatte wird durch Signalstoffe der Chorda ausgelöst (Larsen 1993), die Mechanismen sind u.a. Wechselwirkungen zwischen Signalstoffen der BMP- und FGF-Familien. Bei der Festlegung der Rechts-Links-Achse wurden dem parakrin wirkenden Faktor nodal (Blum et al. 2007) und dem Transkriptionsfaktor pitx2 Regulatorfunktionen nachgewiesen (Beckers et al. 2007; Vick et al. 2009; Torlopp et al. 2014). Beim Huhn wird speziell auf der rechten Seite die *sonic hedgehog*-Expression gehemmt, während der Primitivstreifen seine größte Länge erreicht. Diese Hemmung geschieht durch Aktivin und seinen Rezeptor (Varlet und Robertson 1997), aktivin stimuliert gleichzeitig die Expression von fgf8. Fgf8 soll eine inhibierende Wirkung auf *caronte* ausüben und dadurch den BMPs ermöglichen, *nodal*, *lefty1* und *lefty2* zu inhibieren (Beckers et al. 2007; Blomberg et al. 2008). Diese wiederum würden sonst *pitx2* aktivieren und *snail* inhibieren. Lefty1 unterliegt ebenfalls der Regulation durch *sonic hedgehog* (Logan et al. 1998; Schneider und Brueckner 2000), *dll1* und *notch* regulieren ebenfalls *nodal*, *lefty* und *pitx2* (Krebs et al. 2003), bei *dll1*<sup>-/-</sup> Mäusen fehlt die *nodal*-Expression im Knoten vollständig. Welsh et al. (2015) beschreiben einen Zusammenhang zwischen *pitx2* und dem sog. ASE (*conserved intronic enhancer*), (Norris et al. 2002), *claudin-10* ist ebenfalls an der Regulation beteiligt (Collins et al. 2015). Auch Mutationen des *Pkd 1/1* und *Pkd 2* verursachen Seitendefekte (Field et al. 2011). Die genaue Funktionsweise dieser Signalketten ist aber weiterhin unklar.

(Fischer und Pontoglio 2009). Kawasumi et al. (2011) beschreiben einen ANE (*asymmetric node enhancer*) als einen für humanes Lefty1 spezifischen Verstärker, aktiviert durch nodal, unabhängig vom ziliären Fluss. Botenstoffe der Chorda werden außerdem mit der weiteren Differenzierung der Somiten in Verbindung gebracht (Johnson et al. 1994; Fan und Tessier-Lavigne 1994; Roelink et al. 1995; Hammerschmidt et al. 1996; Ericson et al. 1997; Cleaver et al. 2000).

#### 1.4 Gastrulations- und Neurulationsstadien verschiedener Amnioten

Die unterschiedlichen ontogenetischen Mechanismen erzeugen bei adulten Säugern ein relativ ähnliches Bild des Körperbaus, so dass eine ähnliche Organisation und Signalstruktur trotz der unterschiedlichen Morphologie vermutet werden kann.

Bei allen Amnioten handelt es sich durchweg um Bilateria, so dass eine Rolle der das zentrale Achsorgan darstellenden Chorda dorsalis bei der Rechts-Links-Differenzierung plausibel erscheint. Bisher erscheint sowohl eine signalgebende Funktion als auch eine Barrierefunktion für extrachordal erzeugte Signalmoleküle denkbar.

Das Kaninchen bietet sich als Modellorganismus an, da seine Ontogenese im Frühstadium der des Menschen ähnelt, und die morphologischen Verhältnisse wesentlich weniger kompliziert sind, als die der Maus in vergleichbaren Stadien. Aufgrund ihrer komplizierten Faltung bieten sich Nager nicht für einen Vergleich während dieser Stadien an, sind aber aufgrund der wesentlich umfassenderen Kenntnisse über ihr Genom aus der embryologischen Forschung nicht wegzudenken. Eine weitere Spezies, die sich hervorragend als Modellorganismus eignet, ist das Schwein, die frühe Keimscheibe ähnelt der des Menschen und auch adult sind beide Spezies durchaus ähnlich. Wenngleich die speziesspezifischen Unterschiede ausgeprägter sind, werden in größerem Umfang auch Untersuchungen an Hühnerembryonen vorgenommen, da diese besser verfügbar sind und sie sich auch im eröffneten Ei weiter entwickeln können. Dadurch bietet sich die Möglichkeit Manipulationen durchzuführen und deren Auswirkung am noch lebenden Embryo zu beobachten. Das Huhn bietet darüber hinaus den Vorteil der einfacheren Altersbestimmung, da es sich im Brutschrank bei einer definierten Temperatur immer in einem sehr ähnlichen Zeitraum zu einem bestimmten Stadium entwickelt und dann entnommen werden kann. Die Entwicklungsstadien des Huhns werden nach Hamburger



und Hamilton beschrieben. Diese Stadieneinteilung diente ursprünglich als Basis für die Einteilung der Kaninchenkeimscheiben, doch stimmt sie nicht vollständig überein

Tabelle 1: Zusammenfassung der verschiedenen Spezies, der Entwicklungsmerkmale und der Zeitpunkte des Auftretens (Angaben Maus nach Downs und Davies 1993)					
	Huhn	Mensch	Schwein	Kaninchen	Maus
Primitivstreifen	Stadium 2, 6-7 h Stadium 3, 12-13 h	Stadium 6b	Stadium 3	Stadium 3 6,5 dpc	Theiler 9, ES 6,25-7,75 dpc
Primitivknoten	Stadium 4, 18-19 h	Stadium 6b, ~ 13 dpo	Stadium 4, 10-11 dpc	Stadium 4, 7,0 dpc	MS 7,0-7,75 dpc
Chordafortsatz	Stadium 5, 19-22 h	Stadium 7, ~16 dpo	Stadium 5, 10-11 dpc	Stadium 5, 7,25 dpc	Theiler 10, LS 7,0-7,75 dpc
Chordaplatte	Stadium 6, 23-25 h Kopffalte	Stadium 8, ~18 ±1 dpo	Stadium 6, 11-12 dpc	Stadium 6, 7,6 dpc	Theiler 11, LB, EHF, LHF 7,5–8,0 dpc
Occipitale Somiten	Stadium 7, 1-3 Somiten 23-26 h	Stadium 9, 1-3 Somiten ~20 ±1 dpo,	Stadium 7, 1-3 Somiten 12-13 dpc	Stadium 7, 1-3 Somiten 8,0 dpc	Theiler 12, 1-7 Somiten 8,0-8,25 dpc
Zervikale Somiten	Stadium 8, ab 4 Somiten 26-29 h	Stadium 10, 4-12 Somiten ~22 ±1 dpo,	Stadium 8, 4-6 Somiten	Stadium 8, 4-6 Somiten 8,5 dpc	Theiler 13, 8-12 Somiten, 8,5 dpc

#### 1.4.1 Huhn

Die führende Einteilung der Entwicklungsstadien des Huhns ist die Einteilung nach Hamburger und Hamilton, diese wird auch als Grundlage für die vorliegende Arbeit verwendet. Beim Huhn leitet das Auftreten des Primitivstreifens das Stadium 2 ein, dabei ist der Primitivstreifen anfangs von ungefähr gleicher Länge und Breite. Dieses Stadium findet sich durchschnittlich nach sechs bis sieben Stunden Inkubationszeit, doch kann diese Zeit gerade bei den jungen Stadien erheblich variieren. Zhang und Levin (2009) beschreiben bereits hier eine Rechts-Links-Asymmetrie mit depolarisierten Zellen links des Primitivstreifens (Levin et al. 2002). Wird der Primitivstreifen länger, so wird das als Stadium 3 beschrieben, es tritt aber noch keine Primitivgrube, oder gar ein Primitivknoten auf, man rechnet hiermit nach 12 bis 13 Stunden. Dies ist erst im Stadium 4 der Fall, in dem der Primitivstreifen seine maximale

Ausdehnung erreicht, dies findet nach etwa 18 bis 19 Stunden statt. Auch der Primitivknoten ist bereits asymmetrisch, die rechte Seite ist prominenter als die linke Seite des Primitivknotens, dazwischen liegt die Primitivgrube. Die Chorda dorsalis tritt erst im Stadium 5 anterior des Knotens auf, ist hier aber noch relativ kurz und von Mesoderm umgeben, man rechnet hier mit 19 bis 22 Stunden Inkubationszeit (Bancroft und Bellairs 1976). Als wichtiges Kennzeichen ist hier noch das Fehlen der Kopffalte zu nennen, da dies eine recht gute Abgrenzung zum Stadium 6 erlaubt. Beim Huhn wird zusätzlich zum Stadium 5 häufig auch die Länge der Chorda in Millimetern angegeben, da die Chorda im Verlauf des Stadiums 5, ebenso wie der gesamte Embryo, an Länge gewinnt, so wird eine noch genauere Einteilung möglich (Gros et al. 2009). Das Auftreten der Kopffalte definiert das Stadium 6, es ist ein Zwischenstadium mit maximal ausgewachsener Chorda aber noch fehlenden Somiten. Im Stadium 6 finden sich auch recht prominente Neuralfalten, der Primitivknoten erscheint immer noch asymmetrisch (Dathe et al. 2002). Das Stadium 6 findet man in der Regel nach 23-25 Stunden, es ist also ein recht kurzes Durchgangsstadium. Die späteren Stadien werden durch die Anzahl ihrer Somiten festgelegt. Das erste Somitenstadium ist das Stadium 7, es ist gekennzeichnet durch ein bis zwei Somitenpaare. Hier wird die Kopffalte deutlicher. Beim Huhn gilt die Regel „alle drei Somiten ein Stadium“. Drei Somiten kennzeichnen das Stadium 8-, vier das Stadium 8 und fünf Somiten das Stadium 8+. In diesem Stadium differenziert sich auch gut sichtbar die vordere Darmforte. Dies sind aber nicht die einzigen Kriterien, für eine morphologische Spezifizierung der Stadien ist sehr viel Erfahrung notwendig. Die Entwicklung des Kopfes beispielsweise kann zeitlich hinter der Somitenentwicklung zurückliegen oder ihr voraus sein, dies muss bei der Stadieneinteilung zusätzlich berücksichtigt werden. Logan et al. (1998) beschreiben eine asymmetrische Expression von nodal und pitx2 im Hühnerembryo des Stadiums 7-9, morphologisch ist eine Asymmetrie jedoch bereits früher erkennbar.

#### 1.4.2 Kaninchen

Beim Kaninchen tritt der Primitivstreifen in Stadium 3 auf und wächst dann im Stadium 4 zum Primitivknoten aus. Das Stadium 5 zeichnet sich analog zur Entwicklung des Huhnes durch die nach vorn auswachsende Chorda dorsalis aus, die im Stadium 6 schließlich ihre maximale Länge erreicht, bevor im Stadium 7 die ersten Somiten auftreten. Das Stadium 6 scheint auch beim Kaninchen nur ein kurzes

Durchgangsstadium zu sein, da wir mehrfach in einem Wurf mehrere Embryonen des Stadiums 5 und einzelne des Stadiums 7 fanden, ohne dass Embryonen des Stadiums 6 gefunden worden wären. So lässt sich auch die genaue Entwicklungszeit dafür nicht festlegen, doch rechnet man mit ca. 7,6 dpc. Gerade in diesem Entwicklungsalter findet sich aber eine hohe Variabilität. Die Implantation des Kaninchenembryos ist zu diesem Zeitpunkt bereits erfolgt (ca. 6,5 dpc) (Idkowiak 2007). Im Stadium 7 findet sich außerdem die beginnende Herzanlage (Gottschewski 1973), die beim Kaninchen beidseitig kranial angelegt wird und erst später miteinander verschmilzt.

#### 1.4.3 Schwein

Die Stadierung der Schweineembryonen erfolgt analog zu der des Kaninchens, naturgemäß aber an anderen Entwicklungstagen (siehe oben). Nach Streeter (1927) gibt es zumindest bei der Entwicklung des Schweins die Theorie der separaten Entwicklung des Knotens als Signalzentrum und nicht nur als anteriores Ende des Primitivstreifens. Die Implantation des Schweineembryos erfolgt zwischen dem zwölften und fünfzehnten Tag *post conceptionem* (Sage 2005).

#### 1.4.4 Mensch

Die Einteilung der Entwicklungsstadien des menschlichen Embryos wird in der Regel nach Carnegie vorgenommen, an dieser Klassifizierung orientiert sich auch diese Arbeit. Im Stadium 6 beginnt die Bildung des Primitivstreifens und damit auch die Formation des embryonalen Mesoderms als drittem Keimblatt. Der Embryo ist zu diesem Zeitpunkt bereits implantiert. Extraembryonal lassen sich die Bildung des sekundären Dottersackes und der Primärzotten beobachten. Der Dottersackdivertikel, der sich im hinteren Bereich des Embryos ausbildet, ermöglicht erstmals eine morphologische Festlegung des kaudalen Pols der Keimscheibe. Hier wird auch erstmals extraembryonales Mesoderm gebildet, etwas später und weiter kranial dagegen das embryonale Mesoderm. Wie auch beim Kaninchen ist die Keimscheibe zu diesem Zeitpunkt nicht mehr rund, sondern an einem Ende etwas elongiert, doch muss sich dieser schmalere Pol nicht zwingend zum kaudalen Pol entwickeln. Diese Entwicklungsrichtung scheint zwar bevorzugt zu werden, doch ist die Achsentwicklung damit noch nicht eindeutig festgelegt (O'Rahilly 1970). Die Chorda dorsalis ist als

notochordaler Fortsatz im Stadium 7 nach Carnegie zum ersten Mal sichtbar, formt sich aber bereits im Stadium 6b (O'Rahilly und Müller 1987b). Der kraniale Teil des Primitivstreifens wird als recht lockere Zellmasse beschrieben, aus der ventrolateral der Primitivknoten hervorgeht. Bei einigen Individuen ist eine Einsenkung des Ektoderms am hinteren Ende des Knotens beschrieben worden, die eine Abgrenzung vom Primitivstreifen ermöglicht, doch ist dies nicht bei allen Individuen der Fall. Im Primitivknoten dieses Stadiums sind auch interzelluläre Vakuolen beschrieben, gewissermaßen als Vorboten eines Chordakanals. Anders als beispielsweise beim Huhn erreicht der Primitivstreifen des menschlichen Embryos nur ungefähr die Länge der halben Keimscheibe. Charakteristisches Merkmal eines Embryos des Stadiums 7 bleibt aber die Chorda dorsalis, die zum Teil laterale Ausweitungen zeigen kann, die als *mesoblastic wings* bezeichnet werden (Okumura et al. 2009; O'Rahilly und Müller 1987b; Florian und Hill 1935). O'Rahilly und Müller (1987b) differenzieren hier aber zwischen notochordalem Fortsatz und der definitiven Chorda, die erst im Stadium 11 auftritt. Anterior der Chorda dorsalis bildet sich teils im Stadium 7, sicher aber im Stadium 8, hufeisenförmig die Prächordalplatte aus, während im hinteren Teil des Embryos die Primitivgrube entsteht (Müller und O'Rahilly 2003). Der Prächordalplatte wird ein endodermaler Ursprung zugeschrieben, doch kann dies morphologisch nicht mit Sicherheit belegt werden. Im Stadium 7 finden sich außerdem der sich formierende Allantoisdivertikel und daraus entstehend der sich an den Trophoblasten anschließende Haftstiel. Die Primärzotten differenzieren sich allmählich zu Sekundärzotten, während der intervillöse Raum entsteht. In diesem Entwicklungsstadium beginnt auch die Hämato- und Angiogenese, frühester Entstehungsort ist hierbei die Wand des Dottersackes.

Als Kennzeichen für Stadium 8 nennen O'Rahilly und Müller (1987b) neben der nun ausgebildeten Primitivgrube und dem neurenterischen Kanal auch den Chordakanal (O'Rahilly und Müller 1999), Somiten sind in diesem Stadium aber noch nicht erkennbar. Der Chordakanal ist die Fortsetzung der Primitivgrube und ist an der Bildung des neurenterischen Kanals beteiligt (Müller und O'Rahilly 2003). Ein Lumen in der Chorda wird auch von Larsen (1993) beschrieben, in späteren Stadien jedoch eine solide Struktur. Im Stadium 8 beginnt auch die Entstehung der Neuralrinne, die seitlich die Neuralwülste aufwirft, während sich der notochordale Fortsatz zu einer Platte formt, die Neuralrinne und die chordale Platte sind hier gemeinsam ausgeprägt. Diese

Formänderung scheint dabei ebenso wichtig zu sein, wie die Länge des Fortsatzes. Ist dieses Stadium abgeschlossen, so ist auch die Zahl der sich entwickelnden Individuen festgelegt, da mit der Festlegung der Körperachse durch die Chorda eine Zwillingsbildung nicht mehr möglich ist. Am rostralen Ende dehnt sich die Prächordalplatte bis an den Rand der Keimscheibe aus. Chorda und Primitivstreifen erstrecken sich jeweils über etwa die Hälfte der Keimscheibe. Über Primitivstreifen und Primitivknoten findet sich in diesem Stadium noch kein Endoderm. Nach O'Rahilly und Müller (1987b) werden sowohl der Beginn der Chorda dorsalis als auch der des neurenterischen Kanals durch die Primitivgrube angezeigt, die Zellen der Chorda organisieren sich radial um den Kanal herum, bis schließlich der Boden verschwindet. Nach Hamilton et al. (1945; 1972) entsteht der Chordakanal durch eine Invagination des Blastoporus, auch Balinsky (1970) beschreibt eine Verbindung des Kanals zum Knoten. Die Neuralrinne und die notochordale Platte existieren gleichzeitig (O'Rahilly und Müller 1987a; 1987b). Extraembryonal ist der vollständige Verschluss der Decidua über der Implantationsstelle hervorzuheben.

Stadium 9 ist vor allem durch die Ausbildung der ersten drei Somitenpaare gekennzeichnet. Während die Chorda dorsalis weiter an Länge zunimmt, wahrscheinlich durch Proliferation der Zellen im Primitivknoten (Hamilton et al. 1945), dehnt sich der Primitivstreifen nicht weiter aus, erscheint also bezogen auf die Gesamtlänge des Embryos verkürzt. Der mittlere Teil der Chorda weist auch im Stadium 9 noch den Chordakanal als ein zentrales Lumen auf. Dieses Lumen soll bei der Interkalation der Chorda in das Endoderm eine Verbindung zwischen der Amnionhöhle auf Seiten der Primitivgrube und dem ventral gelegenen Dottersack bilden (Hamilton et al. 1945). Diese Verbindung wird als *Canalis neurentericus*, oder neurenterischer Kanal bezeichnet, es kommt zur vollständigen Entwicklung des Chordafortsatzes zur Chordaplatte (Müller und O'Rahilly 2003). Im Stadium 10 entstehen rasch weitere Somitenpaare. Hier ist darauf zu achten, dass nicht wie bei Huhn, Schwein und Kaninchen drei Somiten ein Stadium kennzeichnen, sondern dass im Stadium 10 vier bis zwölf Somitenpaare gefunden werden können. Währenddessen entstehen auch die ersten beiden Pharyngealbögen, nach Müller und O'Rahilly (2003) beginnt hier die Bildung des Notochord *sensu strictu*. Der Schluss des Neuralrohr beginnt im Stadium 10, wird aber am anterioren Ende erst im Stadium 11 vollendet, während der kaudale Neuroporus bis ins Stadium 12 persistiert.

Die Körpergröße, aber auch die Entwicklungszeit können nur Anhaltspunkte für die Stadieneinteilung geben, da sie erhebliche Abweichungen zeigen.

#### 1.4.5 Maus

Die Entwicklungsstadien der Maus werden etwas unterschiedlich klassifiziert, in der vorliegenden Arbeit werden die Einteilungen nach Theiler (1989), Downs und Davies (1993) sowie nach Kaufmann (1995) berücksichtigt. Die Maus als häufigstes und am besten erforschtes Labortier bildet während der Embryonalentwicklung eine Art Zylinderform aus, welche die morphologische Beurteilung von Entwicklungsprozessen schwierig macht. Die Primitivrinne wird bei der Maus zum ersten Mal im Theiler-Stadium 7 sichtbar, der Embryo ist zu diesem Zeitpunkt bereits implantiert. Die Implantation erfolgt nach ca. 4,5 Tagen, der Embryo hat sich in dieser Zeit zu einem Stadium 6 entwickelt. Im Stadium 7 findet ein Wachstum des Embryos in Richtung des abembryonalen Pols der Blastozyste statt, und formt dadurch den charakteristischen Eizylinder. Der Einteilung nach Downs und Davis würde das einem *Early-Streak*-Stadium (ES) entsprechen (6,75-7,25 dpc), entscheidend ist hier das Auftreten frühen Mesoderms, bis zu 50% der Länge der posterioren Embryohälfte. Mit weiterer Entwicklung spricht man nach Downs und Davis vom *Mid-Streak* und dann vom *Late-Streak*-Stadium. Das *Mid-Streak*-Stadium (7,0-7,75 dpc) zeichnet sich v.a. durch die Verlängerung des Primitivstreifens aus, aber auch durch eine weitere Ausdehnung des Mesoderms. Das Stadium Theiler 8 ist gekennzeichnet durch die Entstehung des viszeralen Endoderms. Im Stadium Theiler 9 beginnt sich das intraembryonale Mesoderm zu entwickeln, erste Anzeichen der späteren Achsenbildung lassen sich erkennen. Das Stadium Theiler 10 zeigt eine wachsende Chorda, die ventral zum Teil frei liegt, dennoch ist das Stadium als Stadium des Primitivstreifens beschrieben (Downs und Davies 1993; Sulik et al. 1994). Sulik et al. (1994) beschreiben hier freie zentrale Zilien auf der Chorda. Im Stadium 10 beginnt die Gastrulation mit ihren typischen Zellbewegungen. Theiler 11 sieht ähnlich aus, doch ist die Chorda vor dem Knoten wesentlich breiter. In diesem Stadium bildet sich die nach vorn klar definierte Neuralplatte, Somiten sind dagegen noch nicht zu finden. Eine Prächordalplatte ist deutlich sichtbar, weiter kaudal findet sich eine breite notochordale Platte (Sulik et al. 1994). Am ventralen, vorderen Ende des Primitivstreifens, der für dieses Stadium namensgebend ist (*late primitive streak stage 7,25-7,75 dpc* Downs und Davies 1993),

findet sich eine Struktur, die zum Teil auch als „Archenteron“ (Sulik et al. 1994) bezeichnet wird, aber wohl analog zum Hensen'schen Knoten zu sehen ist (Downs und Davies 1993, Bellomo et al. 1996). Dieser Knoten findet sich am Pol des Eizylinders. Nach Sulik et al. (1994) besteht der Knoten der Maus aus zwei Teilen, dem ventralen Archenteron und der dorsalen Seite, die in Kontakt zum umgebenden Ektoderm steht, dazwischen ist eine Basalmembran beschrieben, die am posterioren Ende nicht mehr nachzuweisen ist (Poelmann 1981). Das primitive Endoderm wird allmählich durch das definitive Endoderm ersetzt, während sich erste extraembryonale Blutinseln nachweisen lassen. Mit Bildung der Neuralplatte unterscheidet man nach Downs und Davis die Stadien OB (*No Allantoic Bud* 7,25-7,75 dpc), EB (*Early Allantoic Bud* 7,5-8,0 dpc) und LB (*Late Allantoic Bud* 7,5-8,0 dpc). Im OB-Stadium, Theiler 12, ist der Knoten weiter kaudal beschrieben, in der Videomikroskopie sind motile Zilien beschrieben (Sulik et al. 1994). Es bilden sich die Neuralfalten und der Embryo gewinnt an Breite, die nun die Länge übertreffen kann. Im Alter von 7,5 bis 8,0 dpc werden die Stadien nach der Kopffalte charakterisiert. So spricht man vom *Early Headfold* (EHF) und *Late Headfold*-Stadium (LHF). Es entwickeln sich v.a. Allantois und anteriores Ektoderm weiter, im späten Stadium entsteht auch die Vorderdarntasche unterhalb der Kopffalte. Theiler 12 tritt in der Regel bei einem Alter von 8 bis 8,5 dpc auf und zeigt die ersten Somitenpaare. In diesem Stadium beginnen sich auch die Neuralfalten am oberen Ende zu schließen. Theiler 13 zeigt bereits ein wesentlich komplexeres Bild, der 8,5 bis 9 dpc alte Embryo macht eine Art Drehung durch und zeigt die ersten Pharyngealbögen und den sogenannten optic sulcus. Während beim Kaninchen und beim Huhn die nächsten Stadien durch geringen Zuwachs an Somiten definiert werden, so hat das Stadium 13 der Maus schon 8 bis 12 Somitenpaare. Während der Drehung gelangt das Neuroektoderm, das vorher im Inneren der U-förmigen Gestalt des Embryos lag, auf die Außenseite. Der Knoten liegt jetzt nahe des Hinterdarms. Vollendet ist diese Drehung erst mit 14 bis 16 Somiten, also im frühen Stadium 14 (13-20 Somiten). Im Stadium 13 sind Herz und Darmanlage bereits gut abgrenzbar, während sich das Neuralrohr zunehmend schließt. Downs und Davies (1993) fassen dies als Somitenstadien zusammen, die sie nicht näher differenzieren. Auffallend ist hier eine wesentliche Zeitspanne in der die verschiedenen Stadien gemeinsam auftreten können, dies ist auch bei anderen Spezies zu beobachten, doch zumindest beim Kaninchen geschieht dies

nicht in diesem Ausmaß. Nach Sulik et al. (1994) liegt die Chorda im Stadium 14 ventral nicht frei.

## 1.5 Rechts-Links-Differenzierung

Im Allgemeinen wird von einer Festlegung der Rechts-Links-Differenzierung durch einen so genannten *nodal flow* ausgegangen, einem Transport ausgelöst durch den nach links gerichteten Schlag von Zilien auf der Chorda dorsalis (Vandenberg und Levin 2010, Fox et al. 2015). Die Zilien finden sich nicht auf dem Knoten, anders als es der Name vermuten lässt. Der Nachweis bei der Maus erfolgte u.a. durch McGrath et al. (2003), beim Kaninchen durch Okada et al. (2005) und Feistel und Blum (2006). Konkurrierende Hypothesen gehen von anderen Mechanismen der Rechts-Links-Differenzierung aus. Die propagierten Mechanismen lassen sich in extrazelluläre und intrazelluläre Mechanismen einteilen.

### 1.5.1 Extrazelluläre Mechanismen

Die Zilien weisen im Allgemeinen einen sehr ähnlichen Grundaufbau auf, ein Basalkörperchen oder Kinetosom unter der Zelloberfläche und das Axonem, wie die besondere Mikrotubulusorganisation genannt wird, die nach außen ragt. Das Basalkörperchen seinerseits enthält ein Paar Zentriolen als prominenteste Struktur, die den Mikrotubuli der Kinozilien als Ausgangspunkt dienen. Die Zentriolen bestehen aus neun Triplettten, wobei von den inneren beiden Mikrotubuli die Kinozilien entspringen. Diese zeigen dann in der Regel eine  $9 \times 2 + 2$  Konfiguration. Die Mikrotubuli wiederum sind durch diverse andere Proteine verbunden. Den Zilien werden auch Funktionen bei der Signalübertragung, beispielsweise im *wnt*- oder *hedgehog-pathway* zugeschrieben (D'Angelo und Franco 2009; Wilson et al. 2009; Goetz und Anderson 2010; Wallingford und Mitchell 2011; Schatten und Sun 2011; Ajima und Hamada 2011; Lancaster et al. 2011; Zaghloul und Brugmann 2011; Tasouri und Tucker 2011). Merzdorf (2007) und Fujimi et al. (2012) zeigten einen Zusammenhang von *zic3* mit der Suppression von *wnt* und  $\beta$ -catenin, in Verbindung mit der Entwicklung der Chorda dorsalis.

Primäre Zilien zeigen eine  $9 \times 2 + 0$  Konfiguration (Babinger und Witzgall 2010), hier fehlen Dyneine, Nexine und andere Strukturen. Dagegen sollen sie mechanosensitive Calcium-Kanäle besitzen, so dass Calcium-induzierte Zellreaktionen wie



Genexpression, Differenzierung etc. vermutet werden. Eine Ausnahme sind die Zilien der Chorda, diese sind zwar auch  $9 \times 2 + 0$  konfiguriert, besitzen aber Dynein. Sie zeigen eine typische Rotation gegen den Uhrzeigersinn und sollen die Achsenentwicklung festlegen, außerdem soll es zu einer erhöhten Calciumkonzentration auf der linken Seite kommen (Babinger und Witzgall 2010). Feistel und Blum (2006) wiesen außerdem eine neue Art Zilien im Bereich der Chorda des Kaninchenembryos nach, diese zeigten eine  $9 \times 2 + 4$  Konfiguration.

Mitchell et al. (2007) postulieren einen positiven Feedback-Mechanismus des linksgerichteten Flusses auf die Positionierung der Zilien auf den Zellen, deren Position wiederum entscheidend für das Zustandekommen eines gerichteten Flusses ist, eine eher posteriore Neigung der Zilien führt zu einem gerichteten Fluss (Nonaka et al. 2005; Borovina et al. 2010; Antic et al. 2010; Hashimoto et al. 2010; Gray et al. 2011; Nakamura und Hamada 2012). Sampaio et al. (2014) zeigten im Zebrafisch eine zilienabhängigen Fluss mit Einfluss auf die Rechts-Links-Differenzierung, ebenso einen Zusammenhang mit *dnah7*.

Der Zilienschlag ist jedoch keineswegs die einzige Aufgabe des Dyneins, es ist auch für den intrazellulären Transport von entscheidender Bedeutung. Zudem sind bei einigen Organismen andere Mechanismen der Rechts-Links-Differenzierung etabliert (Gros et al. 2009; Hamada und Tam 2014; Mendes et al. 2014).

In einigen Tiermodellen wird über einen einseitig gerichteten Transport von Signalmolekülen durch Zilienrotation auf einer freien ventralen Chordaoberfläche diskutiert, eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche laterale Differenzierung. Diese These wird unterstützt durch das gehäufte Vorkommen eines *Situs inversus* bei Patienten mit immotilen Zilien. Molekularbiologisch müssten sich demnach motile Zilien auf der ventralen Chordaoberfläche nachweisen lassen.

Das Grundgerüst motiler Zilien wird durch Mikrotubuli gebildet, entscheidend für die Bewegung sind aber die Motorproteine, von denen das Dynein eine herausragende Rolle spielt.

Evolutionär ist die Proteinfamilie des Dyneins hoch konserviert. So finden sich speziesübergreifend große Ähnlichkeiten jeweils eines Dyneins, die verschiedenen Dyneine untereinander zeigen jedoch große Unterschiede. Man unterscheidet schwere,

intermediäre, leichte intermediäre und leichte Dyneinketten sowie verschiedene Dyneine, die durch Nummern gekennzeichnet sind. Es werden zwei Klassen von Dyneinen unterschieden: axonemale, die für die Bewegung von Zilien und Flagellen verantwortlich sind, und zytoplasmatische Dyneine, die für den Transport von Membranorganellen entscheidend sind (Crackower et al. 1999). Dyneine sind Proteine aus mehreren Untereinheiten, im Allgemeinen finden sich äußere und innere Arme des Dyneins, die als Querbrücken die Mikrotubulusdoubletten verbinden (Asai und Brokaw 1993). Die Mikrotubuli sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulindimeren aufgebaut. Diese Dimere wiederum sind mit jeweils 2 GTP und einem Magnesiumion zu langen longitudinalen Protofilamenten zusammengelagert, von denen sich in der Regel 13 zu einer spiraligen Mikrotubuluswand zusammenlagern (Benninghoff und Drenckhahn 2003). Je nach Zellart können unterschiedliche Tubulinuntereinheiten unterschieden werden, im Embryo ist dies allerdings noch nicht näher untersucht. Das Minusende des Mikrotubulus trägt seinen Namen deshalb, weil hier keine Polymerisation stattfindet. Die Dyneinköpfe, die die Bewegung durchführen, heften am B-Tubulus, die Stiele der Arme am A-Tubulus. Die schweren Ketten sollen die ATPase-sensitive Region und einen Teil der Motorfunktion enthalten, während die leichteren Ketten für die Regulation der Motorfunktion wichtig sind.

Für den Zilienschlag ist die Struktur der Mikrotubuli eine besondere, die von den für den intrazellulären Transport verantwortlichen Mikrotubuli abweicht. Während der intrazelluläre Transport durch Dynein und Kinesin entlang der Mikrotubuli verläuft, basiert die Zilienbewegung aufgrund einer Dynein-basierten Verschiebung der Mikrotubuli gegeneinander (Benninghoff und Drenckhahn 2003). Neben dem Dynein ist das Kinesin das wichtigste Motorprotein. Beide Transportformen verlaufen ATP-abhängig, indem die Moleküle unter ATP-Spaltung Konformationsänderungen durchmachen. In der Regel transportieren Kinesine zum Pluspol des Mikrotubulus und die Mehrheit der Dyneine zum Minuspol (Asai und Brokaw 1993). Dadurch wird die Transportrichtung geregelt, während bestimmte Rezeptoren für eine spezifische Bindung an Organellen, Membranen und anderes sorgen. Ein weiteres wichtiges Protein, das ebenfalls mit Chiralität und Rechts-Links-Differenzierung in Zusammenhang gebracht wird ist Aktin (Naganathan et al. 2016).

Ausgehend von der Theorie, dass die Rechts-Links-Differenzierung durch einen extrazellulären Signalstofftransport ausgelöst wird, muss ein entsprechender Transportmechanismus nachgewiesen werden. Eine gerichtete Zilienrotation soll den für eine seitenspezifische Entwicklung erforderlichen Gradienten aufbauen. Problematisch ist dabei jedoch die Situation beim Schwein, da dieses ventral keine freie Oberfläche aufweist und dementsprechend keine Zilien auf der Chorda dorsalis zu finden sind. Auch beim Huhn gibt es ventral eine Schicht Endoderm, das den Knoten und das Mesoderm der notochordalen Platte ventral bedeckt und so einen Zilienschlag unmöglich macht (Gros et al. 2009). Naganathan et al. (2014) zeigten bei *C. elegans* Aktomyosin als verantwortliche Komponente der Rechts-Links-Differenzierung.

### 1.5.2 Intrazelluläre Mechanismen

Den genannten extrazellulären Mechanismen als mögliche kausale Faktoren der Rechts-Links-Differenzierung können intrazelluläre Mechanismen gegenübergestellt werden. Zu diesen gehören z.B. der Aufbau eines asymmetrischen Zytoskeletts durch den MTOC (*mikrotubule-organizing center*) (Aw und Levin 2009; Vandenberg und Levin 2010) und eine asymmetrische Anordnung bestimmter Bestandteile in der Zelle, so z.B. der Ionenkanäle und Pumpen, die ihrerseits asymmetrisch einen Spannungsgradienten erzeugen (McGrath et al. 2003). Es kommt zu einem asymmetrischen Calcium-Signal an der linken Knotenseite; motile Ird-haltige Monozilien erzeugen einen Fluss, immotile polycystin-2-haltige Zilien detektieren den Fluss und erzeugen das Calcium-Signal. In *Xenopus*, dem Krallenfrosch, wurden eine V-ATPase-H<sup>+</sup>-Pumpe, ein H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Austauscher, assoziierte Proteine sowie einige Kaliumkanäle als entscheidend für die Asymmetrie identifiziert (Levin et al. 2002; Aw et al. 2010; Gokey et al. 2015), bei Mutationen kommt es gehäuft zu Heterotaxie, einem unvollständigen *Situs inversus*. Sie erbrachten auch den Nachweis, dass eine Blockade von Kaliumkanälen die Rate an Lateralitätsdefekten in Embryonen erhöhte, bei einer Blockade mit Omeprazol fand sich eine fehlende asymmetrische Genexpression und links-gerichtete Knotenbewegung im Huhn (Gros et al. 2009). Des Weiteren scheinen ATP-abhängige Kaliumkanäle auch für die Funktion von *tight junctions* entscheidend zu sein, auch diese sind entscheidend für eine korrekte Rechts-Links-Differenzierung. Levin (2009) hebt bioelektrische Signale als mögliche Transmitter in der Rechts-Links-Differenzierung hervor.

Das sogenannte F-Molekül (Vandenberg und Levin 2009; Santos und Reiter 2010) wird auch als Ursprung der Rechts-Links-Asymmetrie diskutiert, es handelt sich um ein chirales Molekül, das nur als ein Enantiomer zu finden ist. Dieses Molekül befindet sich in einer spezifischen Ausrichtung intrazellulär, so dass es in einer bestimmten Richtung zu den Körperachsen orientiert ist und wahrscheinlich die Richtung des intrazellulären Transports beeinflusst. Dies würde auch das Konzept der *planar cell polarity* (PCP) stützen (Fischer und Pontoglio 2009). Bei *Xenopus* wurde eine bestimmte Orientierung der Zilien-tragenden Zellen gezeigt, die auch bei der Zellteilung erhalten bleibt und für eine achsengerechte Orientierung sorgt, ein Konzept, dass auch auf die Chorda zutreffen könnte (Wibowo et al. 2011).

Im Frosch zeigt sich das PCP-Effektor-Protein *fuz* auch als entscheidend für die Entstehung von Zilien und signifikant für die Steuerung durch *hedgehog* (Gray et al. 2009). *Dishevelled* und *frizzled* zeigten sich ebenso verantwortlich für die PCP (Maurus und Kuhl 2004; Vladar und Axelrod 2008; Hashimoto und Hamada 2010). Zhang und Levin (2009) wiesen nach, dass die PCP im Huhn entscheidend ist für die Rechts-Links-Asymmetrie. *Wnt* und andere Signalwege, wie z.B. *Tbx6*, sind für die PCP ebenso wichtig wie für die Ziliogenese (Wedlich 2002; Nakaya et al. 2005; Hadjantonakis et al. 2008; Hashimoto et al. 2010; Bettencourt-Dias et al. 2011). Tasouri und Tucker (2011) postulieren den Basalkörper als einen entscheidenden Regulator für den *wnt-pathway*. In der Maus zeigten ependymale Zellen in Reifung einen orientierten Zilienschlag als Antwort auf hydrodynamische Kräfte, im Knoten könnte ein gleichartiger Mechanismus bestehen. An der Regulation könnte *vangl2* beteiligt sein (Guirao et al. 2010; Borovina et al. 2010), *vangl1* hingegen an der Positionierung der motilen Zilien auf der Zelle, mit der Konsequenz einer beeinträchtigten Rechts-Links-Differenzierung in *vangl1*-Morpholinos (Antic et al. 2010).

### 1.5.3 Genetische Mutationen mit Bezug zur Rechts-Links-Differenzierung

Die *primary ciliary dyskinesia* (PCD) ist eine normalerweise autosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei der die Motilität der Zilien gestört oder aufgehoben ist (Leigh et al. 2009a). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das genetische Bild heterogen ist. Tritt zusätzlich auch ein *Situs inversus* auf, so spricht man vom Kartagener-Syndrom. Synonyme für das Kartagener-Syndrom sind Kartagener-Trias, Kartagener-Krankheit und *Chandra-Khetarpal-syndrome*. Symptome treten an allen Organen auf, deren

Funktion auf Zilienmotilität beruht (Roy 2009), dabei ist das respiratorische System ebenso betroffen wie die Fertilität (Hirokawa et al. 2009). Defekte in ziliären Motorproteinen scheinen dabei eine naheliegende Ursache zu sein. Namensgebend für die Kartagener-Trias sind Bronchiektasie, *Situs inversus* und *Polyposis nasi*. Der Name Kartagener-Syndrom geht auf den schweizer Internisten Manes Kartagener zurück, der 1933 das Syndrom zum ersten Mal beschrieb (Brueckner 2001). Als Erstmanifestation der Krankheit zeigen sich in der Regel die Atemwege betroffen (Leiber und Olbrich 1957). Weitere Manifestationsorte sind Nebenhöhlen und Ohr, letzteres sowohl durch entzündliche Vorgänge als auch verminderte Hörfähigkeit. Klinische Symptome sind neben der Bronchiektasie mit chronischer Bronchitis auch rezidivierende Pneumonien und Bronchorrhoe. (Leigh et al 2009a; 2009b; Skeik und Jabr 2011). Neben den Atemwegen sind auch die Nebenhöhlen oft durch eine chronische Sinusitis mit der schon genannten *Polyposis nasi* und Rhinorrhoe betroffen (Sironen et al. 2011). Diese Veränderungen können oft auch im Röntgenbild als zystische, helle Strukturen in der Lunge, oder Schatten in den Nasennebenhöhlen sichtbar gemacht werden. Der oft als herausragendes Merkmal genannte *Situs inversus* wird dagegen meist nur als Zufallsbefund festgestellt, es handelt sich dabei aber keineswegs immer um einen vollständigen *Situs inversus*, dieser kann auch nur partiell ausgeprägt sein. 90% der Patienten mit PCD zeigen ultrastrukturelle Defekte, aber nur 50% zeigen Abweichungen bei der Ausbildung der Körpersymmetrie (Bettencourt-Dias et al. 2011). Verschiedene andere Missbildungen können mit dem *Situs inversus* assoziiert sein, neben Veränderungen des knöchernen Thorax können auch Herzfehler und Lungenfunktionsstörungen auftreten. Insuffizienzen verschiedener Drüsen, Oligophrenie und Trommelschlegelfinger sind weitere, wenn auch nicht obligate Auffälligkeiten. Ursache für die häufigen Entzündungen ist wahrscheinlich die verminderte Selbstreinigungsfähigkeit der betroffenen Organe, da Schleim, Fremdkörper und Erreger nicht mehr durch Zilienschlag abtransportiert werden können, prominentestes Beispiel hierfür ist die mukoziliäre Clearance der oberen Atemwege, wobei die Symptome der cystischen Fibrose ähneln. Die Transportminderung beruht bei der cystischen Fibrose, bzw. Mukoviszidose aber auf dem Defekt eines Transportproteins, dem CFTR-Kanal, dessen Funktion wesentlich für die Zusammensetzung des Sekretes ist. Nicht genau geklärt ist die Ursache der Häufung eines Hydrocephalus bei PCD, dies könnte auf verminderte Zilienfunktion der

Ependymzellen zurückzuführen sein. Mirzadeh et al. (2010) zeigten, dass Zilien eine entscheidende Rolle in der Organisation der Zellpolarität des Ependyms spielen.

Eine fehlerhafte Dyneinstruktur kommt als Ursache für die ziliäre Immobilität in Betracht, da anders als früher postuliert, die axonemale Ultrastruktur der Zilien dabei oft unverändert zu sein scheint. Nach Schwabe et al. (2008) sind die äußeren Dyneinarme intakt. Es wird aber ein Zusammenhang zu *DNAH 11* (*dynein heavy chain 11*) hergestellt, da in einigen Untersuchungen alle erkrankten Individuen heterozygote Mutationen im Gen für *DNAH 11* aufwiesen (Tan et al. 2007). Leigh et al. wiesen bei 80% ihres Patientenkollektivs veränderte Dyneinarme nach (Leigh et al. 2009a). Dextrokardie mit unvollständigem oder vollständigem *Situs inversus* tritt nach Schwabe et al. (2008) bei 50% der PCD-Patienten auf. Die verminderte Fertilität der PCD-Patienten beruht auf einer verminderten Spermienmotilität, eventuell auch auf einer verminderten oder ungerichteten Zilienbewegung in der *Tuba uterina*. Die Zilien werden unterteilt in motile und immotile 9+2 und 9+0 Zilien (D'Angelo und Franco 2009; Schatten und Sun 2011; Tasouri und Tucker 2011, Odate et al. 2016). Feistel und Blum (2006) beschreiben in der Chorda dorsalis des Kaninchenembryos auch Zilien mit einer 9+4 Ultrastruktur. Im embryonalen Knoten werden motile 9+0 Zilien beschrieben, die als einzelnes Zilium auf jeder Zelle für die korrekte Entwicklung des Embryos von entscheidender Bedeutung sein sollen. Unterschieden werden müssen auch sensorische und motorische Zilien (Abdul-Majeed et al. 2012). Für die Darstellung des äußeren Dyneinarmes nutzten Schwabe et al. (2008) Antikörper gegen DNAH 9 und DNAH 5. Sie beschreiben normale axonemale Strukturen, normale äußere Dyneinarme und normale „radial spokes“, doch wiesen sie Mutationen in Exon 75 und Exon 82 von *DNAH 11* nach (Schwabe et al. 2008). So wäre die Dysfunktion der Zilien an nichtfunktionelles Dynein gekoppelt, obwohl dessen Ultrastruktur unverändert scheint. Durch Immunofluoreszenz zeigten sie, dass DNAH 9 distal im Axonem respiratorischer Zilien lokalisiert ist, DNAH 5 und 11 dagegen auf ganzer Länge des Axonems und auch basal.

Leigh et al. (2009a) machen vor allem Mutationen in *DNAH 5* und in *DNAI 1* (*dynein axonemal intermediate chain 1*) für die PCD verantwortlich (Roy 2009; Skeik und Jabr 2011). Es existieren Tiermodelle für die PCD, darunter Hund, Katze, Schwein, Ratte und Maus, doch konnte das entscheidende Gen noch nicht eindeutig identifiziert werden

(Leigh, Pittman et al. 2009). Vick et al. (2009) stellen den Zusammenhang von *dnah5*, *dnah9* und *dnah11* mit der Achsenentwicklung von Mensch, Maus und Zebrafisch her. *Dynein 9* steht nach Vick et al. (2009) in engem Zusammenhang mit der Zilienbewegung in den Stadien der Neurulation. Essner et al. (2005) konnten mit sog. Morpholino-Analysen gegen left-right-dynein mit defektem Zilienschlag Achsenfehler zeigen, ebenso mit *dnah5* (Vick et al. 2009), *dnah7* (Sampaio et al. 2014) und *dnah9*-knockdown (Vick et al. 2009).

Bartoloni et al. (2001 und 2002) schließen *DNAH 9* als verantwortliches Gen für PCD aus, vermuten aber eine Beteiligung von *DNAH 5*, *DNAH 11* und *DNAI 1*, ebenso Leigh et al. (2009a), Leigh et al. (2009a) testeten PCD-Familien und konnten keine Mutation von *DNAH 9* nachweisen. Geremek et al. (2011) führen alle o.g. Dyneine als potentiell ursächlich für PCD auf. Bartoloni et al. (2001) beschreiben eine *missense*-Mutation (*E2271K*) des *dnah 11*-Gens in der Maus, das durch *Situs inversus* und immotile Zilien am Primitivknoten gekennzeichnet ist. Die Mutation betrifft in diesem Fall die Motordomäne, aber auch die Mikrotubuli-bindende Domäne könnte betroffen sein. In betroffenen Mäusen wurde eine deutliche Verminderung des Flüssigkeitstransports festgestellt. Bei gezielter Störung der Genfunktion wurden Seitendefekte und immotile Zilien festgestellt. *Chlamydomonas* weist ein Gen auf, das *β-heavy chain dynein* und *left-right-dynein (lrd)*, das als homologes Gen in der Maus bei Mutationen Motilitätsdefekte der Zilien hervorruft und zum *Situs inversus* führt (Supp et al. 1997, Leigh et al. 2009a), analog der schweren Kette des dynein 11). Auch im Menschen sind z.B. *nonsense*-Mutationen nachgewiesen, entsprechende Patienten wiesen einen *Situs inversus* auf. Da der betreffende Patient gleichzeitig unter einer cystischen Fibrose litt und keine ultrastrukturellen Defekte an Zilien nachgewiesen werden konnten, gilt die Diagnose PCD nicht als gesichert. Auch in Patienten mit Kartagener-Syndrom fanden sich Mutationen des *DNAH 11*, hier ebenfalls mit ultrastrukturellen Normalbefunden, aber abweichendem Zilienschlag. McGrath et al. (2003) zeigten GFP-markiertes *lrd* nur in den Monozilien der posterioren Chorda dorsalis.

Neben Dyneinen sind auch Kinesine an der Rechts-Links-Differenzierung beteiligt, Pearson (2011) beschreibt KIF24 als regulierendes Protein der Ziliogenese. *Noto*, *foxj1* und *rfx3* sind nach Beckers et al. (2007) ebenfalls essentiell für die Rechts-Links-Differenzierung, ein *rfx3*-Defekt führt demnach zu ultrastrukturell normalen aber

kurzen Zilien und Rechts-Links-Defekten (Bonnafe et al. 2004, Beckers et al. 2007). D2lic, ein zytoplasmatisches Dynein wird vermindert exprimiert. *Foxj1*-Mutanten fehlen Zilien, *dnah11* wird nicht exprimiert, und es kommt ebenfalls zu Rechts-Links-Defekten. In der Maus führt das Fehlen von *noto* zur Rechts-Links-Fehldifferenzierung, es scheint also *upstream* zu wirken, darüber hinaus scheint auch die Differenzierung der Chorda dorsalis gestört zu sein. *Dnah5*, das ebenfalls im Knoten exprimiert wird, unterliegt auch der Regulation durch *noto*. *CCDC39* ist entscheidend für die Anordnung innerer Dyneinarme und des Dynein-regulierenden Komplexes (Merveille et al. 2011), so führen Ziliendefekte in *Old English Sheepdogs* zu Rechts-Links-Defekten. Zebrafisch-Morpholinos mit supprimiertem entsprechendem Gen zeigten eine erhöhte Rate an Herzfehlbildungen und Rechts-Links-Defekten. *CCD40* scheint die Funktion von *CCD39* ebenfalls zu beeinflussen, die ziliäre Funktion zeigt sich bei entsprechenden Mutationen zusätzlich beeinträchtigt (Becker-Heck et al. 2011). Auch *CCDC11* und *CCDC151* Mutationen führen zu Zilienfehlfunktionen und *Situs inversus* (Hjej et al. 2014, Narasimhan et al. 2015).

Kinzel et al. (2010) konnten zeigen, dass *pitchfork*-Mutationen zu Missbildungen der Zilien führen und nachfolgend zu einer gestörten Rechts-Links-Differenzierung. *DNAH 5* geriet früh in den Verdacht ursächlich für die PCD zu sein, da eine Mutation im homologen Gen in *Chlamydomonas*, dort als  $\gamma$ -heavy chain bezeichnet, für Immotilität der Flagellen und *ODA* (*outer-dynein-arms*)-Defekte sorgt (Leigh et al. 2009a). Bei weiteren Untersuchungen fanden sich bei 28% der untersuchten PCD-Patienten Mutationen im Gen für *DNAH 5*. Die Mutationen fanden sich hauptsächlich in Exon 34, 50, 63, 76 und 77. Entlang des axonemalen Schaftes allerdings konnte kein *DNAH 5* nachgewiesen werden.

Kawakami et al. (2008) zeigten in ihrem iv-Maus-Modell eine Rate von 50% Mäusen mit *Situs inversus* bei 50% mit dem normalen *Situs solitus*. Diese Mäuse zeigten bei einer Mutation im *left-right-dynein* immotile Zilien, die daher unfähig waren, den vorher beschriebenen Fluss zur linken Körperseite aufrechtzuerhalten. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag allerdings auf der Rechts-Isomerie des Hippocampus bei den iv-Mäusen. Supp et al. (1997) gehen sogar so weit, dass sie dem *left-right-dynein* eine Funktion nicht nur bei der Entstehung, sondern auch bei der Aufrechterhaltung der Rechts-Links-Differenzierung zuschreiben und eine Funktion des



ird auch in Zellen ohne Zilien annehmen. Stern (2002) verweist auf Versuche von Nonaka et al. (2002), dass ein künstlicher Fluss zur Kontrolle der Rechts-Links-Differenzierung in i.v.-Mäusen ausreicht.

Die *inv*-Maus zeigt neben dem *Situs inversus* auch eine Nephronophthisis (Typ 2). Das Maus-Gen *inv* ist dabei homolog zu dem menschlichen Gen *NPHP2*, einem Gen, das sich häufig bei Patienten mit polyzystischen Nierenerkrankungen finden lässt. Homozygote *inv*-Mutanten starben in der Regel innerhalb von sieben Tagen, wahrscheinlich bedingt durch Malformationen des Situs. Träger einer *invΔC*-Mutation dagegen zeigten nur Nierenveränderungen und keine Situs-Abnormalitäten, die Lebensdauer betrug nach Okumura et al. (2009) über sechs Wochen, die Nierenzysten zeigten ein langsames Wachstum. Das *inv*-Protein ist demnach wichtig für die Zilienlokalisierung auf Nierenepithelzellen, nach Hildebrandt et al. (2009) zeigen Menschen mit entsprechenden Mutationen zusätzlich oft einen Ventrikelseptumdefekt. *NPHP2* ist für den *Non-canonical Wnt-pathway* und die PCP entscheidend, ohne findet kein *switch* vom *canonical* zum *non-canonical pathway* statt (Bettencourt-Dias et al. 2011). Shiratori und Hamada (2006) zeigten bei betroffenen Mäusen einen langsameren und turbulenten *flow* nach links. Babinger und Witzgall (2010) zeigten eine Homologie zu *diego*, einem PCP-Gen in *Drosophila*, mit vergleichbarer Wirkung auf den *wnt-pathway*. Eine Analyse des normalen Zilienschlags mit Vergleich zu *inv*-Mutanten zeigte nach Buceta et al. (2005) einen reversen Zilienschlag.

#### 1.5.4 Die Rolle axonemaler Dyneine in der Rechts-Links-Differenzierung

Vick et al. (2009) beschrieben das Expressionsmuster der Dyneine *dnah 5*, *dnah 9* und *dnah 11* bei *Xenopus laevis*. Dabei wurden sehr frühe Stadien untersucht. *dnah 9* fand sich dabei in der Zygote und im 4-Zell-Stadium im animalen Pol des sich entwickelnden Keimes. In der dorsalen Urmundlippe fanden sich auch in späteren Stadien noch positive Expressionsnachweise. Die Expression von *dnah 5* und *dnah 11* fiel geringer aus, *dnah 5* wird ab dem Neurula-Stadium exprimiert, *dnah 11* in den so genannten tailbud-Stadien. Die Genexpression zeigte dabei eine auffallende Korrelation mit Zilien tragenden Zellen. Die Unterdrückung dieser Gene brachte eine Fehlentwicklung der Körperachsen mit sich.

In frühen Stadien zeigt der sich entwickelnde Mäuseembryo eine symmetrische Expression des Ird-Dyneins im Knotenbereich, bei Mutationen kommt es zur zufälligen Rechts-Links-Differenzierung (*iv*-Maus und *lgl* (*legless*)-Maus, mit Verlust der Zilienmotilität (Supp et al. 1999). Essner et al. (2002) beschreiben eine Ird- und Dnahc5 Expression im Bereich des ventralen Knotens, und bringen *DNAH5* Mutationen mit einem *Situs inversus* und Zilienimmotilität beim Menschen in Verbindung (vgl. auch Ibanez-Tallon et al. 2002). Supp et al. (1997) beschreiben eine Expression des left-right-dyneins im Bereich des Knotens, jedoch auch bei embryonalen Stammzellen und im Stadium der Blastozyste, so dass die Expression nicht auf Zilien-tragende Zellen limitiert zu sein scheint.

Beckers et al. (2007) zeigten eine übergeordnete Funktion des *noto*-Gens für die Regulation der Rechts-Links-Differenzierung, insbesondere in Bezug auf die Expression von *foxj1*, *lefty*, *pitx2* und *left-right-dynein*.

Feistel (2006) untersuchte verschiedene Genexpressionen im Kaninchen, darunter auch *lrd*. Das left-right-dynein zeigte im Stadium 4 eine Expression v.a. im Bereich des Primitivknotens, im Stadium 5 und 6 in der Chorda dorsalis mit Betonung des hintersten Abschnitts. Im Stadium 7 erschien die Expression fast vollständig rückläufig, im Bereich des Knotens zeigte sich noch eine Färbung in der *In-situ*-Hybridisierung.

Qiu et al. (2005) publizierten einen Expressionsnachweis des left-right-dyneins im Hühnerembryo. Im Hühnerembryo erscheint demnach das Expressionsmuster anders als in den anderen Spezies. In frühen Stadien erscheint eine Expression im Primitivstreifen, im Stadium 4 sieht man die Farbreaktion der *In-situ*-Hybridisierung unilateral neben dem Primitivstreifen und direkt anterior des Primitivknotens (Qiu et al. 2005).

## 1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Hinweise auf eine mögliche molekulare Funktion bei der Rechts-Links-Differenzierung zu finden, die einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Chordamorphologien und der Rechts-Links-Differenzierung der verschiedenen Spezies herstellt. In diesem Zusammenhang erscheint die Untersuchung von Motorproteinen als lohnend.

Da die Chorda dorsalis sich in verschiedenen Tiermodellen unterscheidet und wahrscheinlich eine Rolle in der Rechts-Links-Differenzierung spielt, sollen verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung kommen, Daher besteht ein Teil dieser Arbeit in einer morphologischen Beschreibung der Verhältnisse in Kaninchen und Schwein, mit einem Vergleich zu anderen Tiermodellen, um trotz der unterschiedlichen morphologischen Gegebenheiten mögliche übergeordneten Gemeinsamkeiten zu finden, die sich in einem zweiten Schritt gegebenenfalls auch auf den Menschen übertragen lassen.

Für die Beteiligung der Dyneine an der Rechts-Links-Differenzierung waren zunächst Lokalisation und Zeitpunkt der Proteinexpression von Interesse. Es sollte eine Betrachtung der topographischen Verteilung der Dyneine im Embryo während der Entwicklung der Chorda und in der Phase der ersten Rechts-Links-Differenzierung erfolgen. Möglich wäre eine Expression auf der Chorda oder in umliegenden Strukturen. Von Interesse war die zeitliche Korrelation der Dyneinexpression mit der Phase der Rechts-Links-Differenzierung.

Im Lichte der Untersuchung soll danach diskutiert werden, ob extrazelluläre Mechanismen an der Differenzierung der Rechts-Links-Orientierung beteiligt sind. Ergänzend sollen potentielle extrazelluläre und intrazelluläre Mechanismen gegenübergestellt werden. Aus all diesem ergab sich die Frage nach einer Beteiligung an extrazellulären Mechanismen der Seitendifferenzierung, wie sie für die gerichtete Zilienbewegung propagiert wird. Aber auch die prinzipielle Möglichkeit einer Beteiligung an intrazellulären Mechanismen soll diskutiert werden. Noch offen ist die Frage nach der Existenz gemeinsamer Mechanismen. Untersucht werden soll das Vorhandensein von Gemeinsamkeiten, die Hinweise auf die Möglichkeit eines einheitlichen Mechanismus für die Rechts-Links-Differenzierung bieten. Unklar ist auch welche der Hypothesen durch solche Gemeinsamkeiten gestützt würde.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die experimentellen Arbeiten wurden am Institut für Anatomie, Abteilung Anatomie und Embryologie der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt. Die gentechnischen Arbeiten wurden gemäß dem Sicherheitsstandard für die Sicherheitsstufe 1, gemäß dem Gentechnikgesetz (GenTG, 20.06.1990) durchgeführt. Bei allen Arbeiten galten zudem die laborüblichen Sicherheitsbestimmungen der Universität Göttingen. Für die morphologische Beurteilung standen Semidünnschnitte und Dünnschnitte von Embryonen der Stadien 5, 6 und 7 sowohl vom Kaninchen als auch vom Schwein zur Verfügung. Zusätzlich bestand die Möglichkeit einen menschlichen Embryo des Stadiums 8 zu fotografieren. Dabei wurden folgende Materialien, Protokolle und Gewebe eingesetzt.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

Arbeitsbank (steril) Hera safe	Heraeus (Hanau)
Brutschrank, Heracell 150 Tri-Gas Cell Culture	Heraeus (Hanau)
Incubator	
Elektrophoresekammer	AGS GmbH (Heidelberg)
Elektrophoresekammer, Shandon southern SAE 2761 voKam	OWL (über Nunc (Langenselbold) oder VWR (Darmstadt))
Feinwaage, Sartorius TE214S	Sartorius (Göttingen)
Mikrotom Jung RM2065	Leica (Bensheim)
Mikrowelle, MD10482	Medion (Mühlheim)
MiniCentrifuge Model GMC-060	UMS Co LTD
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg), Gilson inc. (Middleton, WI, USA)
Pipetus	Eppendorf (Hamburg), (Reddot) Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Radiometer copenhagen PHM61 laboratory,	Radiometer AIS (Kopenhagen)
pH-Meter	

Schüttel-Inkubator, innova™ 4000 Inkubator Shaker	New Brunswick Scientific (Nürnberg)
Spannungsgerät shandon southern SAE2761	Vokam (Manchester, GB)
Speedvac concentrator 5310	Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock	Grant instruments (Cambridge, GB)
Thermocycler, PTC-200 Peltier Thermal cycler	Biozym (Oldendorf)
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
UV Tisch Epichemi3 Darkroom und Kamera INTAS302	Intas (Göttingen)
Vortex, Heidolph REAX top	Heidolph (Schwabach)
Waage, Sartorius excellence	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad, Lauda A 100	Lauda (Lauda-Königshofen)
Wippe (elektrisch), Vari-Mix	Barnstead/Thermoline (Dubuque, USA)
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)

### 2.1.2 Mikroskopie

Stereolupe Stemi SV11 mit Digitalkamera	Zeiss (Jena)
Mikroskop, Axioplan 2 mit Kamera	Visitron systems (Puchheim)
Mikroskop, Axioplan mit AxioCam MRc5	Zeiss (Oberkochen)
Immersionsöl für Mikroskopie	Intas (Göttingen)
	Zeiss (Oberkochen)
	Merck KGaA (Darmstadt)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

24-Well-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
4-Well-Platten	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Bakterien-Kultur-Röhrchen T406-2A	Simport (Beloeil, QC, Kanada)
Cryo Cups	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Filtertips TipOne 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab (Ahrensburg)

Kryogefäße, Micro-Röhrchen, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten, UVette <sup>®</sup> Photometer 220-1600 nm	Eppendorf (Hamburg)
Multipette-Combitips	Eppendorf (Hamburg)
Nitrilhandschuhe	Kimberley-Clark (Koblenz-Rheinhafen)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Organkulturschalen, Falcon <sup>®</sup>	Becton, Dickinson Labware and Company (Le Pont De Claix, Frankreich)
Parafilm	Pechiney plastic packaging (Chicago)
Petrischalen (Ø 4 cm, 6 cm, 10 cm)	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Polypropylenröhrchen 20 ml mit Deckel	Elkay (Hampshire, GB)
Reaktionsgefäße, für PCR, 0,5 ml 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpellklingen	Aeskulap (Tuttlingen)
Tablettenhülsen	Bayer (Leverkusen)

#### 2.1.4 Allgemeine Laborchemikalien

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (München)
Ethanol absolut	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol absolut für Molekularbiologie	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fluka (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze)
Formamid	Fluka (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze)
Glycerol wasserfrei, reinst	Merck KGaA (Darmstadt)
HCl	AppliChem (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt)
KCl	Merck KGaA (Darmstadt)
LiCl <sub>2</sub>	Calbiochem (Merck) (Darmstadt)
Mowiol 4-88	Hoechst (Frankfurt)
NaCl	AppliChem (Darmstadt)
Tris für Molekularbiologie	AppliChem (Darmstadt)
TrisBase	Calbiochem (Merck) (Darmstadt)

### 2.1.5 Pharmakologische Substanzen

Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Mexical GmbH, (Halbergmoos)
Predalon 500® (Humanes Choriongonadotropin, hCG)	Organon (Oberschleißheim)

### 2.1.6 Substanzen für die Molekularbiologie (inkl. Primer)

dNTP's	Roche (Mannheim)
MgCl <sub>2</sub>	Roche (Mannheim)
NucleoSpin Extract II-Kit (TE-Puffer, NT-Puffer, Säulchen, NT3-Puffer, NE-Puffer)	Macherey-Nagel (Düren)
PCR-Puffer 10x (KCl)	Roche (Mannheim)
Taq-Polymerase	Roche (Mannheim)

### 2.1.7 Substanzen für die PCR

#### Substanzen für die cDNA-Herstellung

5x First-strand reaction buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
CDSII-A-Primer	biomers.net GmbH (Ulm)
Gesamt-RNA	Eigenherstellung
Revert Aid (200 U/µl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNAse OUT	Fermentas (St. Leon-Rot)

#### Primer

Dynein 5, *forward primer* 5'-AGGCTGTTTTGGCAGTCCTTGC-3'

Dynein 5, *reverse primer* 5'-GCCTGTGCCTGGAGCCTTCAC-3'

Dynein 5, *forward primer nested* 5'-TCCATCTGGAACCAGCCGAC-3'

Dynein 5, *reverse primer nested* 5'-GATCCTGTGGAAGAGCTGACG-3'

Dynein 9, *forward primer* 5'-GCTGAGAACGATCAAGGTGC-3'

Dynein 9, *reverse primer* 5'-CACGAGCTGCCGATAGAACT-3'

Dynein 9, *forward primer nested* 5'-AGCTCTAACTGAGGCACAGG-3'  
Dynein 9, *reverse primer nested* 5'-GGATCACGTCTCAGAAGTGG-3'  
Dynein 11, *forward primer* 5'-AGAGAGATCGAACACGGATGC-3'  
Dynein 11, *reverse primer* 5'-AAAGCCTTCCACCACCATGTC-3'  
Dynein 11, *forward primer nested* 5'-GGTCCAACCTTGCTTCTCTCC-3'  
Dynein 11, *reverse primer nested* 5'-ACTTCCTGGTGAACACGTTGC-3'

Die kaninchenspezifischen Sequenzen wurden mittels einer Nucleotid-Suche in Pubmed ermittelt und mittels eines Alignments in Clustalw mit anderen Säugersequenzen verglichen. Kaninchenspezifische Abschnitte aus dem Alignment wurden in ein „*Primer designing tool*“ eingespeist, bzw. in das Programm Primer Designer 2.2 (*Scientific and educational software*). Mit Hilfe dieser Programme wurden die oben genannten Primer ermittelt und von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Analog wurden die Primer für die Sequenzen vom Schwein erstellt.

Folgende Sequenzen wurden als Primer verwendet:

Dynein 5, *forward primer* 5'-GGTTGGACGGCATGGTCACTAAAT-3'  
Dynein 5, *forward primer nested* 5'-TCTTGGACCAGCGGAAAATGGA-3'  
Dynein 5, *reverse primer* 5'-GCCAGGAGCCTTCACCAATAAAGA-3'  
Dynein 5, *reverse primer nested* 5'-CTTCAGTTTGCTGAAACCATGCCC-3'  
Dynein 9, *forward primer* 5'-GGCCTACGCCATGCGAGATTTTAT-3'  
Dynein 9, *forward primer nested* 5'-CCTGGACTTCGCAGCCTCATT-3'  
Dynein 9, *reverse primer* 5'-TCCATTAAAATCACCAGCGAGCCG-3'  
Dynein 9, *reverse primer nested* 5'-ATTCAGGGTCTTCATCAGTGCCGA-3'  
Dynein 11, *forward primer* 5'-TGCTGGCACCAGGATTTGCAGC-3'  
Dynein 11, *forward primer nested* 5'-CTCTTGCGATGCCGGGAACTCG-3'  
Dynein 11, *reverse primer* 5'-CCCCTTGGCCGTCTTCTCTTTGC-3'  
Dynein 11, *reverse primer nested* 5'-TCCTGTCTGTCCATGGGGATGGC-3'



### 2.1.8 Substanzen für die Bakteriologie

Eco RI Restriktionsendonuklease und Puffer	Fermentas (St.Leon-Rot)
Kompetente <i>E. coli</i> (Stamm "DH5 $\alpha$ ")	Laborbestand
Ligationskit (Rapid Ligation Buffer 2x; pGEM-TEasy; T4-DNA-Ligase, Control insert DNA)	Promega (Mannheim)
Natrium-Acetat	Merck KGaA (Darmstadt),
NucleoSpin Plasmid-Kit (A1-Puffer, A2-Puffer, A3-Puffer, AW-Puffer, A4-Puffer, AE-Puffer, Säulchen)	Macherey-Nagel (Düren)

### 2.1.9 Primer für die Colony-PCR

pGTup-Primer	biomers.net GmbH (Ulm)
pGTR-Primer	biomers.net GmbH (Ulm)

### 2.1.10 Substanzen für den RNA-Sondenbau

Dig-RNA-Labeling Mix	Roche (Mannheim)
RNA-Polymerase SP6	Roche (Mannheim)
RNA-Polymerase T3	Roche (Mannheim)
RNA-Polymerase T7	Roche (Mannheim)
Transkriptionspuffer 10x	Roche (Mannheim)

### 2.1.11 Substanzen für die *In-situ* Hybridisierung

(Boehringer) Blocking Reagent	Roche (Mannheim)
Anti-Dig-Antikörper	Roche (Mannheim)
BM-Purple AP Substrate	Roth (Mannheim)
Chaps (3-((3Cholamidipropyl) dimethylammonio)-1-propane sulfonate)	Biomol (Hamburg)
Heparin	Novo, Applichem (Darmstadt)
Levamisol	Sigma (Taufkirchen)
Maleinsäure	Serva (Heidelberg)
MgCl <sub>2</sub> 25Mm	Fermentas (St. Leon-Roth)

NGS (Normal goat serum/Ziegenerum)	Sigma (München)
Proteinase K	Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg)
SSC (Saline-sodium citrate buffer)	Sigma (Taufkirchen)
t-RNA	Sigma (München)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen)

#### 2.1.12 Chemikalien für die Gelelektrophorese

DNA-Marker 100 bp, Marker III	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethidiumbromid 0,07 %	AppliChem (Darmstadt)
Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
Orange G	Sigma (Taufkirchen)
RNA-Probenpuffer	Roche (Mannheim)
Seakem LE Agarose (Gel)	Cambrex (Charles City, IA, USA)
TAE-Puffer 50x	AppliChem (Darmstadt)

#### 2.1.13 Standardlösungen

Paraformaldehyd	Merck KGaA (Darmstadt), Roth GmbH&Co (Karlsruhe), Serva (Heidelberg)
PBS	Roche (Mannheim)
PBS Dulbecco	Biochrom (Berlin)
Tris	Sigma (München)

#### 2.1.14 Nährmedien und Zusätze

Agar-Agar	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Ampicillin 50 mg/ml	Roche (Mannheim)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Trypton	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Yeast extract für Bakteriologie	Roth GmbH&Co (Karlsruhe)

SOB-Medium:

10 g Bakto-Trypton

2,5 g Hefeextrakt

0,25 g NaCl

mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt, gut gemischt und autoklaviert.

LB-Medium:

10 g Bakto-Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

in 950 ml bidestilliertem Wasser gelöst,

mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt,

mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

200 ml des LB-Mediums mit 3 g Agar versetzt, dienen zum Gießen der Platten, 400 µl Ampicillin wurden nach dem Aufkochen hinzugefügt.

2.1.15 Lösungen für die *In-situ*-Hybridisierung

DEPC-H<sub>2</sub>O:

1000 ml *Aqua bidest.* + 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat), gut mischen, 2 h unter dem Abzug bei Raumtemperatur stehen lassen, gelegentlich mischen und anschließend autoklavieren.

PBT:

0,1 % Tween 20 in PBS-DEPC

PBS-DEPC:

100 ml 10x PBS + 900 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

Proteinase K:

100 mg + 10 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, Aliquots bei -20 °C lagern

MAB:

100 ml Maleinsäure (Endkonzentration 100 mM)

100 ml NaCl (Endkonzentration 150 mM)

Auffüllen auf ca. 800 ml, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

mit *Aqua bidest.* auf 1000 ml auffüllen

MABT:

MAB + 1 ml Tween (Endkonzentration 0,1 %),

NTMT:

40 ml Tris (1 M) (Endkonzentration 100 mM)

8 ml NaCl (5 M) (Endkonzentration 100 mM)

20 ml MgCl<sub>2</sub> (1 M) (Endkonzentration 50 mM)

0,8 ml Levamisol (1 M) (Endkonzentration 2 mM)

0,4 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,1 %)

Mit *Aqua bidest.* auf 400 ml auffüllen

BBR (Boehringer Blocking Reagenz) (jetzt Roche):

5 g BBR in 50 ml MAB, 30 min bei 70 °C, dabei gut mischen, Aliquots bei -20 °C lagern

NGS (Normal goat serum/Ziegenserum)

100 ml über Nacht bei 4 °C auftauen lassen,

zum Deaktivieren 60 min 60 °C im Wärmeschrank

Aliquots bei -20 °C lagern

Chaps:

1 g in 10 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren, im Kühlschrank dunkel lagern

Heparin:

50 mg in 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

t-RNA:

2000 U in 10 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren, Aliquots bei -20 °C lagern

### 20x SSC:

Gebrauchslösung auf pH 4,5 einstellen

### 0,5M EDTA:

18,61 g in 60 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen, mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

### Hybemix 50 ml (180 ml für 10 Körbchen)

Formamid	25 ml
20x SSC (pH 4,5)	3,5 ml
t-RNA (10 mg/ml)	0,25 ml
0,5M EDTA (pH 8)	0,05 ml
Tween 20	0,1 ml
10 % Chaps	2,5 ml
Heparin (50 mg/ml)	0,05 ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	18,6 ml

## 2.1.16 Materialien für die histologische Aufbereitung

Araldit	Serva (Heidelberg)
Glutaraldehyd	Serva (Heidelberg)
Osmium	Merck KGaA (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen)
Propylenoxid (1,2-Epoxypropan)	Serva (Heidelberg)
Phosphatpuffer	Roche (Mannheim)
Technovit 8100-Kit (Infiltrationsmedium, Härter 1, Härter 2)	Heraeus Kulzer, Mitsui Chemicals Group, Hanau

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Embryonen und Gewebepräparation

Bei den Versuchstieren handelte es sich um ca. drei Monate alte Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer. Die Kaninchen wurden zunächst hormonell stimuliert, dazu wurden 180 I.E. Predalon 500® (hCG) in den *Musculus quadriceps femoris* injiziert, auf weitere Stimulierung wurde verzichtet.

Die Besamung der Kaninchen erfolgt in der Regel mittels Natursprung, in Ausnahmefällen kann jedoch auch eine künstliche Besamung durchgeführt werden. Dies geschieht vier Tage nach der Hormongabe. Das Alter der Embryonen wird in dpc, also Tagen nach der Befruchtung gerechnet. War die festgelegte Zeit nach der Besamung verstrichen, so wurde den Kaninchen eine Überdosis Narcoren in die Ohrvenen gespritzt. Dieses Medikament mit dem Wirkstoff Pentobarbital-Natrium unterliegt dem Betäubungsmittelgesetz. Der Uterus und die Ovarien wurden in toto entnommen und in PBS transportiert. Bei jüngeren Stadien war es möglich, die Embryonen durch Spülung des Uterus zu gewinnen, Embryonen nach der Nidation mussten einzeln herauspräpariert werden. Die Embryonen wurden eine Stunde in PFA fixiert und anschließend in PBS bei 4 °C aufbewahrt. Sie durchliefen als nächstes eine aufsteigende Alkoholreihe mit je fünf Minuten in 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Ethanol, bevor sie in 100 % Ethanol bei -20 °C eingefroren wurden.

Die Schweineembryonen erhielten wir aus dem Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Löffler-Institut, Neustadt-Mariensee, nach der regulären Schlachtung der zuvor besamten Tiere. Der Transport und die Präparation erfolgte analog der Vorgehensweise beim Kaninchen. Die Mäuse (*Mus musculus*, C57BL/6 (BL6) Stamm) erhielten wir vom ZTE der Universitätsmedizin Göttingen, die Präparation der Embryonen erfolgte, wie bereits beim Kaninchen beschrieben.

### 2.2.2 Histologie

Die Embryonen für die Semidünnschnitte wurden in Araldit eingebettet und auf 1µm Dicke geschnitten. Dafür wurden die frisch gewonnenen Embryonen von Maus, Kaninchen und Schwein über einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden nach Karnovsky fi-

xiert. Das Fixationsmittel setzt sich zusammen aus 6 ml Glutaraldehyd (25 %) und 6 ml Paraformaldehyd (25 % in 45 ml 0,2 M Phosphatpuffer ad 100 ml aqua bidest.) und ist auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt. In der Endkonzentration ist eine Osmolalität von 700-800 mosmol/kg notwendig. Anschließend erfolgten zwei fünfminütige Waschschriffe in 0,1 M Phosphatpuffer. Die Semidünnschnitte wurden auf den Objektträgern mit Methylblau gefärbt. Dazu wurde ein Tropfen der Methylblaulösung auf den Schnitt gegeben und der Objektträger auf eine Wärmeplatte gelegt, so dass die Lösung etwas antrocknete. Sobald sich ein metallisch-schimmernder Rand am aufgelegten Methylblau-Tropfen gebildet hatte, wurde der Objektträger gespült und hinterher auf der Wärmeplatte getrocknet. Ergänzend wurden bereits vorhandene, mit derselben Verfahrensweise hergestellte Schnittserien verwendet.

Zur Gewinnung der Hühnerembryonen wurden befruchtete Hühnereier (*Gallus gallus*, *White leghorn*) 20-48 h bei 38 °C inkubiert, um Embryonen der Stadien 4-7 nach Hamburger und Hamilton zu erhalten (Tsikolia et al. 2012), das Ei vorsichtig eröffnet und die Embryonen mit Fixationslösung unterspritzt und in Locke'sche Lösung verbracht.

Die morphologische Analyse eines menschlichen Embryos erfolgte anhand einer bereits vorhandenen Schnittserie aus der Sammlung Steding, die bereits in einer Doktorarbeit an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen veröffentlicht worden war (Sander 2002). Der Embryo stammt aus der Durchmusterung einer medizinisch indizierten Abrasio und wurde zufällig gefunden. Ca. 30 min nach dem Eingriff erfolgte die Fixierung in einer Lösung nach Bouin, zuvor war das Präparat mit physiologischer Kochsalzlösung gespült worden. In aufsteigender Alkoholreihe und Methylbenzoat erfolgte die Dehydratation, im Anschluss die Einbettung in Paraffin. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

### 2.2.3 Herstellung von RNA-Sonden

#### Herstellung von cDNA

Aus Gesamt-RNA eines Kaninchenembryos (Individuum GE 89.3 von 90/04, Eigenherstellung, 13 dpc) wurde cDNA hergestellt. Dabei wurde das Protokoll für eine Two-step RT-PCR von Fermentas befolgt. Dafür wurden 3 µl der RNA mit 2 µl „CDSII A“ Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl gemischt und 6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O hinzugefügt.

Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µl „5fach First-strand reaction buffer“ hinzugegeben, ebenso 1 µl „RNase OUT“ und 2 µl dNTP's in einer Konzentration von 10 mMol. Dieses Gemisch wurde 2 Minuten bei 42° C inkubiert, 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 1 µl „Revert Aid“ hinzugegeben so dass sich ein Gesamtvolumen des Ansatzes von 20 µl ergab. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, 10 Minuten auf 70 °C erwärmt und anschließend auf Eis gekühlt. Die Gesamt-RNA für die Analyse im Schwein wurde aus Material der Tuba uterina nach dem bereits beschriebenen Verfahren aus einem Gewebelysat hergestellt.

### Polymerase-Ketten-Reaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Dieser Ansatz stellt die Grundlage für die erste PCR-Reaktion mit spezifischen Primern dar. Dazu wurde ein Master-Mix angesetzt mit 20 µl 10fach PCR-Puffer auf KCl-Basis, 4 µl dNTP's, 12 µl MgCl<sub>2</sub>, 151 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 1 µl Taq-Polymerase. Von diesem Mastermix wurden 47 µl pro Probenansatz eingesetzt, hinzugegeben wurden je 2 µl der zuvor hergestellten cDNA, 1 µl des forward Primers für dynein 5, 9 oder 11 und 1 µl des dazugehörigen reversed Primers. Der Ansatz durchlief dann im Thermo-cycler das Programm D\_PCR mit 1 Minute 95 °C, eines Dreischritts von 30 Sekunden 95 °C, 30 Sekunden 47 °C und 1 Minute 72 °C, der 40 Mal wiederholt wurde und eines abschließenden Schritts von 10 Minuten bei 72 °C. Anschließend wurden die Proben wieder heruntergekühlt. Je 5 µl der Ansätze wurden mit 2 µl 6fach Loading Dye gemischt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, das Gel lief bei 80 V. Nachdem die Gelkontrolle die Banden der erwarteten Größe gezeigt hatte, wurden die PCR-Ansätze aufgereinigt. Dies geschah mit dem NucleoSpin Extract II-Kit, dazu wurden 40 µl des PCR-Produktes mit 10 µl TE-Puffer und anschließend mit 100 µl NT-Puffer gemischt. Dieses Gemisch wurde auf eine NucleoSpin Extract II Säule aufgebracht und 1 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert, der Durchfluss wurde sicherheitshalber zunächst aufbewahrt. 700 µl NT3-Puffer wurden auf das Säulchen gegeben, eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Säulchen wurde zwei Minuten bei 70 °C inkubiert, gewaschen wurde zwei Mal. Dazu wurden 20 µl NE-Puffer auf das Säulchen gegeben, es eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen und 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. 1 µl der aufgereinigten Probe wurden in 49 µl NE-Puffer verdünnt und für die Dichtemessung im Photometer eingesetzt.



## *Nested PCR*

Für die *nested PCR* wurde ein neuer Mastermix angesetzt, dieser beinhaltete 60 µl 10fach PCR-Puffer auf KCl-Basis, 12 µl dNTP's, 36 µl MgCl<sub>2</sub> und 441 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. 91,5 µl des Mastermixes wurden mit je 2 µl des entsprechenden *nested forward* und 2 µl des entsprechenden *nested reverse* Primers, 4 µl des aufgereinigten PCR-Ansatzes und 0,5 µl Taq-Polymerase versetzt. Je ein Ansatz für dynein 5, 9 und 11 wurde mit dem Programm der D\_PCR behandelt, ein zusätzlicher Ansatz von dynein 5 und dynein 11 durchlief ein anderes PCR-Programm (PCR28\_03), dabei betrug die Annealing-Temperatur 50 °C und nicht 47 °C wie bei der D\_PCR, ansonsten waren die Programme identisch (siehe oben). Auch von dieser PCR wurde eine Gelkontrolle angefertigt, jedoch wurden statt 5 µl PCR-Ansatz 8 µl eingesetzt. Zur Kontrolle wurden auch 4 µl der PCR-Aufreinigung mit auf das Gel aufgetragen. Nachdem auch diese Gelkontrolle Banden der erwarteten Fragmentlänge zeigte, wurde eine Aufreinigung der Nested PCR nach dem oben beschriebenen Protokoll mit Nucleospin Extract II durchgeführt. Von dieser Aufreinigung wurde ebenfalls eine Gelkontrolle angefertigt, wobei 1 µl des Ansatzes eingesetzt wurden. 1 µl dieser Aufreinigung wurde mit 49 µl NE-Puffer zur Dichtemessung verdünnt. Der entscheidende Vorteil der Nested PCR ist nicht nur eine weitere Amplifizierung der cDNA-Fragmente, sondern auch eine noch höhere Spezifität des Ergebnisses, da nur DNA-Stücke vervielfältigt werden, auf die sowohl das erste Primerpaar, als auch das weiter innen liegende zweite Primerpaar spezifisch aufsetzt.

## Ligation und Klonierung von cDNA-Fragmenten

Die Ligation wurde nach dem Protokoll von Promega durchgeführt. 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 5 µl 2fach Rapid Ligation Buffer, 1 µl pGEM T-Easy-Vektor, 2 µl des aufgereinigten Nested PCR-Produktes und 1 µl T4-DNA-Ligase wurden gemischt und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Für die Positivkontrolle wurden statt des PCR-Produktes 2 µl Control-Insert-DNA eingesetzt. Für die Transformation wurden kompetente Zellen (*E. coli* DH5α) auf Eis aufgetaut und 3 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben. Die Bakterien wurden 20 Minuten auf Eis stehen gelassen, 90 Sekunden bei 42 °C erwärmt und 1 Minute auf Eis abgekühlt. Bei Raumtemperatur wurden 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOB-Medium hinzugegeben und das Eppendorf-Cup eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank liegend inkubiert. Mit Ampicillin versetzte Agar-Platten wurden mit 100 µl

IPTG und 20 µl X-Gal behandelt. Die Bakteriensuspension wurde 20 Sekunden bei 14.000 U/min zentrifugiert, 1 ml SOB-Medium abgenommen und das Bakterienpellet im verbleibenden Volumen resuspendiert, bevor es auf die Platten ausgebracht wurde. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht in den Brutschrank verbracht. Da es einige Schwierigkeiten mit dem Bakterienwachstum gab, wurden beim letzten Transformationsansatz die Bakterien nur 60 Sekunden auf 42 °C erwärmt und nur 800 µl SOB hinzugegeben. Auf die Behandlung der Platten mit IPTG und X-Gal wurde verzichtet, und die gesamte Bakteriensuspension unzentrifugiert auf zwei Platten ausgebracht. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden gepickt und in eine Flüssigkultur verbracht, gleichzeitig wurde ein Teil jeder Kolonie in eine Colony-PCR eingesetzt. Der Mastermix für die Colony-PCR bestand aus 430 µl 10fach PCR-Buffer auf KCl-Basis, 86 µl pGTup-Primer, 86 µl pGTR-Primer, 258 µl MgCl<sub>2</sub>, 86 µl dNTP's, 3246,5 µl bidestilliertes Wasser und 21,5 µl Taq-Polymerase. Davon wurden je 50 µl in ein PCR-Tube verbracht, in dem vorher ein Teil der Bakterienkultur ausgestrichen war. Das Programm der Colony-PCR umfasst 10 Minuten bei 94 °C, dann einen 35 Mal wiederholten Dreischnitt von 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 56°C und 1 Minute bei 72 °C, anschließend 10 Minuten bei 72 °C und dann auf Eis herunter kühlen. Jeweils 5µl des Colony-PCR-Produktes wurden mit 2 µl 6fach Loading Dye gemischt, auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Spannung von 100 Volt angelegt. Für die Über-Nacht-Kultur wurden die Pipettenspitzen, mit denen die Kolonien gepickt worden waren, in Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium und Ampicillin verbracht (50 ml LB-Medium mit 100 µl Ampicillin versetzt). Diese Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für die Plasmid-Präparation mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit wurden 1500 µl, der nach Colony-PCR vielversprechend erscheinenden Proben, dieser Über-Nacht-Kultur am nächsten Tag in Eppendorf-Cups überführt und 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 250 µl A1-Puffer durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Hinzugeben von 250 µl A2-Puffer, das Cup wurde 8 Mal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 300 µl A3-Puffer hinzugegeben wurden und das Cup erneut 8 Mal invertiert wurde. Das Cup wurde 10 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert und der Überstand auf ein Säulchen aus dem Präparationskit gegeben und 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen mit 500 µl auf 50 °C vorgewärmten AW-Puffer gewaschen und erneut eine Minute zentrifugiert, der zweite Waschschnitt erfolgte mit 600 µl

A4-Puffer und erneutem Zentrifugieren. Der Überstand wurde jeweils verworfen und es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt von 2 Minuten bei 11.000 g an. Das Säulchen wurde nun in ein neues Cup überführt und es folgten zwei Elutionsschritte, um die DNA vom Säulchen zu lösen. Dafür wurden bei jedem Schritt 30 µl AE-Puffer auf das Säulchen gegeben, es eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen und eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. 1 µl des Eluats wurden mit 49 µl AE-Puffer verdünnt und zur Dichtemessung eingesetzt. Je 6 µl Eluat wurden mit 2 µl 6fach Loading Dye gemischt und auf ein Gel aufgebracht. 300 ng der Plasmid-DNA wurden jeweils in den Verdau eingesetzt. Der DNA wurden 3 µl Eco-R I-Puffer und 2 µl beziehungsweise 1 µl Eco-R I hinzugefügt und die Ansätze mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf je 30 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 90 Minuten auf 37 °C und 20 Minuten auf 65 °C erwärmt und anschließend dauerhaft auf 4 °C heruntergekühlt. Da die Gelkontrolle des Verdau, von dem 10 µl gemischt mit 2 µl 6fach Loading Dye auf das Gel aufgetragen wurden, Fragmente in der erwarteten Größe zeigte, wurden die Proben aus der Mini-Präparation entweder mit Tris-HCl (pH 8,5, 5 mMol) verdünnt oder ankonzentriert. Dies geschah um die für die Sequenzierung erforderliche Konzentration von 2000 ng DNA in 20 µl Lösung zu erhalten. Um die DNA-Konzentration zu erhöhen, wurde zunächst die entsprechende DNA-Menge aus der zu konzentrierenden Probe mit 1/10 des Volumens an Na-Acetat vermischt. Diese Mischung wurde mit der doppelten Menge an 100 %igem Ethanol versetzt und eine Stunde bei -20 °C stehen gelassen. Es schloss sich ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 0° C an, im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und durch 700 µl 70 % Ethanol ersetzt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C wurde auch dieser als Überstand entfernt und das Pellet in der Eppendorf concentrator 5310 getrocknet (2 Minuten, Vakuum). Das Pellet wurde anschließend in 20 µl Tris-HCl (pH 8,5, 5 mMol) gelöst. Die Proben, die nun alle 2000 ng DNA in 20 µl enthielten, wurden zum Sequenzieren an Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt.

Mit den entsprechenden Proben wurde eine PCR durchgeführt. In die PCR wurden ca. 200 ng DNA, 2 µl pGTup-Primer, 2 µl pGRT-Primer, 6 µl MgCl<sub>2</sub>, 10 µl 10fach PCR-Puffer, 2 µl dNTP's, und 0,5 µl Taq-Polymerase eingesetzt. Die Ansätze wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Im Thermo-cycler durchliefen die Ansätze das Programm PCR34\_09. 1 Minute bei 95 °C, 39 Zyklen mit je 30 Sekunden 95 °C, 30 Sekunden 56 °C, und 1 Minute 72 °C, anschließend folgten 7 Minuten bei 72 °C und ab-

schließlich wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Nach dem bereits beschriebenen Protokoll wurde mit dem NucleoSpin Extract II-Kit der PCR-Ansatz aufgereinigt. Im Anschluss wurde eine Dichtemessung und eine Gelkontrolle angefertigt.

Die mit Bakterien kontaminierten Verbrauchsmaterialien, Lösungen etc. wurden bei 121 °C im Autoklav hitzesterilisiert und anschließend entsorgt.

### *In-vitro*-Transkription

Das Produkt der Aufreinigung wurde in die *in-vitro* Transkription eingesetzt. 1 µl der cDNA wurden mit 13 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 2 µl Polymerasepuffer (Roche), 2 µl Dig-NTP's, 2 µl Polymerase gemischt. Pro PCR-Ansatz wurde eine Transkription mit T7-Polymerase und eine mit SP6-Polymerase durchgeführt. Die Mischung wurde gevortext, anzenrifugiert und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1 µl Polymerasepuffer, 1 µl Dig-NTP's und 1 µl der entsprechenden Polymerase hinzugefügt und der gesamte Ansatz erneut gemischt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Auf Eis wurden 1,5 µl EDTA (0,5 M), 3,75 µl LiCl (4 M) sowie 100 µl 100 % Ethanol hinzugegeben und über Nacht (mindestens 12 h) bei -20 °C stehen gelassen. Am Folgetag wurde die Probe 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 5 µl LiCl und 150 µl 100 % Ethanol wurden hinzugegeben, die Probe eine Stunde bei -20 °C stehen gelassen und anschließend 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, bevor der Überstand erneut abgenommen wurde. Das Pellet wurde 2 Minuten im Vakuum zentrifugiert und so getrocknet, bevor es in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst wurde. 1 µl der so entstandenen RNA wurde mit 9 µl RNA-Probenpuffer gemischt, 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, 2 Minuten auf Eis kühlen die Probe wieder ab. Die so denaturierte Probe konnte zusammen mit 2 µl Orange G auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Das Gelbild zeigte klare Banden der definierten Größe.

#### 2.2.4 *In-situ*-Hybridisierung an ganzen Keimscheiben

Die in 100 % Methanol oder Ethanol eingefrorenen Keimscheiben wurden zunächst in Körbchen überführt. Körbchen sind kleine Röhrchen mit einem engmaschigen Netz als Boden und einem Loch im Deckel, so dass beim Umsetzen der Körbchen in eine andere Lösung ein Flüssigkeitsaustausch stattfinden kann. Diese Körbchen stammen aus Eigenproduktion. Das Umsetzen der Körbchen geschieht, so nicht anders genannt, in 24-

Well-Platten. Zunächst erfolgten zwei Schritte in einer Lösung aus 70 % Methanol und PBT, die Körbchen wurden jeweils fünf Minuten in einem Well belassen und dann umgesetzt, es schlossen sich zwei Waschschrte mit jeweils 5 Minuten in PBT an, wobei alle bisher genannten Schritte auf Eis erfolgten. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt mit einem Gemisch aus Proteinase K und PBT (2 µl Proteinase in 2 ml PBT), wobei die Inkubationszeit dabei vom Entwicklungsstadium des Embryos abhängig war und für Embryonen des Stadiums 5, 6 und 7 jeweils 15 Minuten betrug.

Tabelle 2: Inkubationszeiten mit Proteinase K in Abhängigkeit von den Entwicklungsstadien	
Entwicklungsstadium	Inkubationszeit mit Proteinase K
0	2 Minuten
1	5 Minuten
2	5 Minuten
3	10 Minuten
4	10 Minuten
5	10-15 Minuten
6	15 Minuten
7	15 Minuten
8	20 Minuten
9	20 Minuten

Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Es schlossen sich zwei Waschschrte mit PBT à 5 Minuten an, gefolgt von 20 Minuten in einer Mischung aus Glutaraldehyd und PBT zum Nachfixieren (16 µl 25 % Glutaraldehyd in 2 ml PBT). Abschließend wurden die Körbchen 5 Minuten in einem 1:1-Gemisch aus PBT und Hybemix, und 5 Minuten in reinem Hybemix belassen. Die Körbchen wurden danach in ein Plastikgefäß mit Schraubdeckel, das mit 900 µl auf 70 °C erwärmten Hybemix gefüllt war, überführt. Diese Vorinkubation muss mindestens 60 Minuten dauern, aber auch mit 2-3 Stunden lassen sich gute Ergebnisse erzielen. Kurz vor Ablauf der Vorinkubationszeit, wurden 100 µl frischer Hybemix mit der zuvor hergestellten Sonde gemischt und bei 95 °C 5 Minuten denaturiert. Diese Mischung wurde mit 900 µl Hybemix, der ebenfalls auf

70 °C erhitzt wurde, gemischt und in ein Plastikröhrchen gegeben. Das Körbchen wurde nach Ablauf der Vorinkubationszeit in das Plastikgefäß mit dieser Lösung überführt. In dieser Lösung verblieb das Körbchen über Nacht (mindestens 12 h) bei 70 °C. Die Menge der zugeführten Sonde wurde auf Basis der zuvor erstellten Gelbilder festgelegt.

Um überschüssige freie RNA zu entfernen wurden die Körbchen am Folgetag zwei bis dreimal in neue, mit 1,5 ml auf 70 °C vorgewärmten Hybemix gefüllte Schraubdeckelgefäße umgesetzt, dies geschah ohne dazwischenliegende Wartezeiten zwei bis drei Mal. Als nächstes wurden sie dreimal für jeweils eine halbe Stunde in 2 ml auf 70 °C vorgewärmten Hybemix überführt. Zum Abschluss der Waschschrte verblieben die Körbchen maximal 15 Minuten in einer 1:1-Mischung aus MABT und Hybemix.

Zum Blockieren und zur Vorbereitung der Antikörperreaktion erfolgten bei Raumtemperatur drei Waschschrte mit je 1,5 ml MABT in einer auf der Schaukel platzierten 24-Well-Platte. Dafür wurden die Körbchen alle 10 Sekunden in ein neues Well überführt. Danach verblieben sie zweimal für je 30 Minuten in MABT. Eine Stunde wurden sie in MABT und 2 % BBR (Boehringer Blocking Reagenz) inkubiert, und eine weitere Stunde in MABT, 2 % BBR und 20 % NGS (Ziegen Serum).

Über Nacht (mindestens 12 h) wurden die Körbchen in MABT, 2 % BBR, 20 % NGS und AP-DIG 1:2000 schaukelnd bei 4 °C inkubiert, Dafür wurde die 24-Well-Platte mit Parafilm abgedeckt, um einem Flüssigkeitsverlust vorzubeugen. Dieses letzte Reaktionsmedium darf erst direkt vor Gebrauch angesetzt werden.

Am dritten Tag der *In-situ*-Hybridisierung wurde zunächst der freie Antikörper ausgewaschen. Dies geschah in drei Waschschrten à 10 Sekunden in MABT auf einer 24-Well-Platte, sowie in sieben halbstündigen Waschschrten in Glaströgen, gefüllt mit ca. 80 ml MABT. Letzteres machte eine Fixierung der Körbchen in einem Schaumstoffhalter notwendig. Anschließend wurden die Körbchen insgesamt vier Mal in gleichartige Glaströge mit NTMT verbracht, in denen sie jeweils 10 Minuten verblieben.

Nachdem dies abgeschlossen war, wurden die Körbchen in eine Petrischale mit NTMT verbracht und die Keimscheiben vorsichtig mittels einer Glaspipette entnommen. Die Keimscheiben wurden in eine 4-Well-Platte mit NTMT verbracht, und anschließend in ein Well mit BM-Purple überführt. Aus diesem Well wurden sie wieder entnommen und in eine Organkulturschale verbracht, in der die Reaktion ablaufen sollte. Der innere

Raum der Organkulturschale war ebenfalls mit BM-Purple gefüllt, der äußere Ring dagegen mit NTMT. Die Organkulturschale wurde anschließend in geschlossene Aluminiumkästen verbracht, in die mit destilliertem Wasser getränkte Papiertücher eingelegt und mit Deckeln von Petrischalen beschwert worden waren. Diese Petrischalendeckel dienten als eine Art Podest, um direkten Flüssigkeitsaustausch zu vermeiden. In diesen Kammern lief nun bei Raumtemperatur die Reaktion ab. Anfangs wurde das Fortschreiten der Farbreaktion stündlich kontrolliert, später erfolgten die Kontrollen in größeren Abständen. Die Farbreaktion wurde gestoppt, indem die Keimscheibe für zehn Minuten in NTMT verbracht, in PBS gespült und dann bei 4 °C in PBS aufbewahrt wurde.

### 2.2.5 Technovit-Einbettung

Zum Fotografieren wurden die Keimscheiben in einem Tropfen PBS auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe von Nadeln ausgebreitet. Anschließend wurde das PBS wieder abgezogen und durch ca. 20 µl Mowiol ersetzt. Darauf wurde vorsichtig ein Deckgläschen gelegt und der Objektträger in den Kühlschrank verbracht. Vor der Einbettung sollten die Keimscheiben mindestens 24 h unter dem Deckglas gelegen haben, damit sie bei der Einbettung ihre Form behalten.

Die Keimscheiben aus der *In-situ*-Hybridisierung wurden in Technovit eingebettet, und später 5 µm dick geschnitten. Vor der Einbettung wurde der Objektträger eine Stunde in 90 % Methanol mit PBS eingelegt um die Keimscheibe vom Glas abzulösen. Die Keimscheibe wurde anschließend für 5 Minuten in 100 % Methanol gebracht und dann für zwei Stunden in Infiltrationsmedium belassen. Größere Embryonen benötigten auch hier eine längere Inkubationszeit.

Das Infiltrationsmedium wurde mit Härter 1 und Härter 2 versetzt und in Tablettenhülsen gegossen, in denen sich ein Podest aus bereits ausgehärtetem Technovit befand, um ein besseres Aufliegen der Keimscheibe zu gewährleisten. Die Positionierung der Keimscheiben im Technovit musste schnell geschehen, die Tablettenhülsen wurden anschließend luftdicht verschlossen. Für die Herstellung der Podeste wurde Technovit in Kapselformen gegossen, in denen es aushärtete. Die Kapseln wurden anschließend in kleine Scheiben geschnitten.

Da das Aushärten des Technovits mit einer erheblichen Wärmeentwicklung verbunden ist, sollte es zum Schutz der Keimscheibe auf Eis härten.

Zur Herstellung der Mowiol-Lösung wurden 10 g Glycerol mit 5 g Mowiol (Hoechst) gemischt, mit 10 ml bidestilliertem Wasser versetzt und zwei Stunden stehen gelassen. Anschließend wurden 12 ml 0,2 molares Tris mit pH 8,5 hinzugefügt und das Gemisch 10 Minuten auf 50 °C erwärmt. Es schloss sich ein fünfzehnminütiger Zentrifugations-schritt an.

### 2.2.6 Fotografie

Die Fotografien entstanden bei 400-facher Vergrößerung und wurden mit Adobe Photo-shop zur Auswertung bearbeitet.



### 3 ERGEBNISSE

Im folgenden Abschnitt werden zunächst morphologische Charakteristika der frühen Chorda dorsalis beschrieben, die allen hier untersuchten Spezies gemein sind, im Anschluss erfolgt die vergleichende Beschreibung der morphologischen Unterschiede der Chorda und ihrer angrenzenden Strukturen nach Stadien geordnet bei fünf verschiedenen Spezies. Die Ergebnisse von Huhn, Schwein und Kaninchen wurden an mehreren Semidünnschnittserien von Embryonen der Hamburger-Hamilton-Stadien 4 bis 7 erhoben, entsprechend wurden auch Mäuseembryonen der Theiler-Stadien 10-12 untersucht, insgesamt also die Stadien mit beginnender Chordaentwicklung bis zum Stadium mit 1-3 Somitenpaaren. Die Beobachtungen des menschlichen Embryos beschränken sich auf die Paraffinschnittserie eines einzelnen Individuums des Carnegie-Stadiums 8 (entsprechend dem Hamburger-Hamilton-Stadium 6).

In einem zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Versuchen zur Genexpression von DNAH5, -9 und -11 in der Chorda dorsalis von Embryonen des Kaninchens der Stadien 4 bis 7 beschrieben (vom Stadium des Primitivknotens bis zum 3 Somitenstadium).

#### 3.1 Vergleichende Strukturentwicklung der frühen Chorda dorsalis

##### 3.1.1 Chronologie und grundlegende strukturelle Merkmale der Chorda dorsalis

Die folgenden allgemeinen morphologischen Kennzeichen der frühen Chordaentwicklung der Amnioten können bei allen hier untersuchten Embryonen in ähnlicher Weise beobachtet werden und sollen deshalb der spezifischen Beschreibung der Chordaentwicklung vorangestellt werden: Als erstes Zeichen der Chordaentwicklung zeigt sich die Entwicklung der Chorda dorsalis als Chordafortsatz, wie bei allen Amnioten am Beginn des Stadiums 5 der Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton, in Form eines vom Primitivknoten (am vorderen Ende des Primitivstreifens) ausgehenden, nach vorne gerichteten Stranges epithelialer Zellen. Ähnlich wie im Primitivstreifen finden sich auch im Primitivknoten zahlreiche Zellen nach basal aus dem epithelialen Zellverband herausgelöst und aus dem Epiblasten in das darunterliegende mesodermale Kompartiment hineinragend. Dabei unterliegen die Zellen einer epithelial-mesenchymalen Transformation. Diese Wanderbewegung wird dadurch ermöglicht, dass an dieser Stelle eine ventrale Abgrenzung (z.B. eine Basalmembran)

zwischen dem Epiblast und dem mesodermalen Kompartiment fehlt, lediglich der an das mesodermale Kompartiment ventral anschließende Hypoblast ist durch eine Basalmembran begrenzt. Der Bereich des Primitivknotens lässt sich anhand der Zellform nach anterior oder posterior nicht eindeutig abgrenzen, im anterior des Primitivknotens definierten Neuroektoderm gibt es jedoch keinen Übertritt von Zellen nach basal, vielmehr ist das Neuroektoderm ventral von einer Basalmembran bedeckt. Das posteriore Ende dieser Basalmembran wird daher für diese Arbeit als anteriore Begrenzung des Primitivknotens angesehen und als chordoneurales Scharnier (*chordoneural hinge*, Charrier et al. 1999, Cambay und Wilson 2002, 2007) bezeichnet. Unterhalb des Primitivknotens und im Primitivstreifen findet sich dagegen keine Basalmembran. Mit der Basalmembran als Indikator für Strukturgrenzen gelingt es somit, auch frühe, noch wenig epithelial organisierte Zellen der Chorda dorsalis zuzuordnen.

Im frühen Stadium 5 erscheinen die Zellen des frühen Chordafortsatzes als locker angeordnete Population von Zellen. Mit der Verlängerung des Chordastranges im weiteren Verlauf des Stadiums 5 ändert sich die Morphologie der Chordazellen: Während sie im Bereich des Knotens noch ungeordnet und rundlich imponieren, gewinnen sie nach vorne an epithelialer Ordnung und eine apikal-basale Polarisierung; die Zellen werden zusehends hochprismatisch und erscheinen eher als Platte angeordnet. Dies kann erstmals in älteren Embryonen des Stadiums 5 gezeigt werden, dabei ist die wachsende Chorda aber immer noch kürzer als der Primitivstreifen. Im Bereich direkt anterior der Chorda findet sich eine weitere Zellpopulation, die sich in ihrem Aufbau und der Zellanordnung erheblich von den Chordazellen unterscheidet. Dies sind die allerersten Zellen, die (bereits im Stadium 4) nach vorne aus dem Primitivknoten ausgewandert sind und vor der Chorda zu liegen kommen. Sie werden hier als prächordale Mesodermzellen bezeichnet. Die eigentlichen (epithelialen) Chordazellen sind erst in etwas weiter entwickelten Embryonen zu finden, d.h. im Stadium 5 und formen dann eine kompakte Zellpopulation, den Chordafortsatz.

Das Stadium 6 weist eine Chorda dorsalis auf, die länger ist als der Primitivstreifen, gleichzeitig sind aber noch keine Somiten abgrenzbar, daher resultiert auch die Bezeichnung des *pre-somite stage*. Der Embryo insgesamt erscheint bereits länger und bei einigen Individuen auch schon tailliert. Im Eizylinder der Maus ist das nur schwer zu erkennen, drückt man den Eizylinder jedoch flach, so ist die Morphologie des

Mäuseembryos der Kaninchenkeimscheibe erstaunlich ähnlich (Feistel und Blum 2008). Die morphologischen Unterschiede zum Stadium 5 sind in der Aufsicht nicht sehr auffällig. Die Morphologie der Chorda ist bei den Spezies ähnlich der Morphologie im Stadium 5, die Verläufe der Zellorganisation lassen sich in kranio-kaudaler Richtung gut erkennen. Insbesondere die Situation der ventralen Bedeckung ändert sich bei einigen Spezies zunehmend, sie ist z.B. beim Kaninchen in anteriorer Richtung deutlich spärlicher, während bei anderen Spezies die Chorda in diesem Stadium noch bedeckt bleibt. (Sausedo und Schoenwolf 1994) beschreiben in der Maus, ebenso wie im Huhn eine anterior-posterior orientierte Zellteilung als entscheidenden Parameter der Längenexpansion der Chorda.

Im Stadium 7 hat die Keimscheibe des Embryos deutlich an Länge gewonnen, auch zeigt sich eine deutliche Taillierung. Dies sind Charakteristika, die sich beim Eizylinder der Maus weniger gut erkennen lassen. Embryonen des Stadiums 7 haben bereits Somiten entwickelt, diese werden zur Charakterisierung herangezogen, deswegen wird das Stadium 7 auch als *early somite stage* bezeichnet. Das Stadium 7 lässt sich daher bereits in der Aufsicht gut abgrenzen, zumindest sofern die Somiten klar differenziert sind. Ist das erste oder vierte Somitenpaar im Entstehen begriffen, muss ggf. in Schnitten nach einer Differenzierung des Somiten gesucht werden, um die genaue Somitenanzahl zu bestimmen. Dabei ist zu beobachten, dass die Somiten nicht auf beiden Seiten synchron entstehen, sondern durchaus eine Seite zeitlich in der Entwicklung voraus sein kann.

Im axialen mesodermalen Kompartiment kann ventral des epithelialen Chordafortsatzes in allen hier untersuchten Embryonen, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung, eine Population rundlicher, eher mesenchymal differenzierter Zellen identifiziert werden, die nach posterior ohne scharfe Grenze zum Mesoderm des Primitivstreifens Kontakt hat. Aufgrund ihrer Morphologie und Anordnung wird diese Zellpopulation nachfolgend als subchordales Mesoderm bezeichnet.

Für die Beschreibung der frühen Chordaentwicklung wurden über diese Kennzeichen hinaus folgende Merkmale herangezogen: die Abgrenzung der Chordazellen – etwa durch das lichtmikroskopische Erscheinungsbild einer Basalmembran – zum umgebenden Gewebe, die epitheliale bzw. mesenchymale Anordnung, und die apikal-

basale Differenzierung der Chordazellen, gegebenenfalls auch das lichtmikroskopisch erkennbare Vorhandensein von Zilien.

In manchen Bereichen der Embryonen dieser Stadien lässt sich mit den angewandten morphologischen Methoden nicht eindeutig entscheiden, ob die ventrale Oberfläche der Embryonalscheibe (noch) von Hypoblast oder (bereits) von Endoderm bedeckt ist. Zum Teil wurde deshalb der Begriff der „ventralen Zellschicht“ verwendet, ohne eine abschließende Klärung der morphologischen Differenzierung und deren zeitliche Abfolge in den betreffenden Stadien vorzunehmen.

### 3.1.2 Stadienbezogene Strukturmerkmale im interspezifischen Vergleich

#### Stadium 5

Hühnerembryonen des Stadiums 5 zeigen ventral der glatten Begrenzung des Neuroektoderms eine noch kurze Chorda dorsalis, deren Zellen locker angeordnet sind,

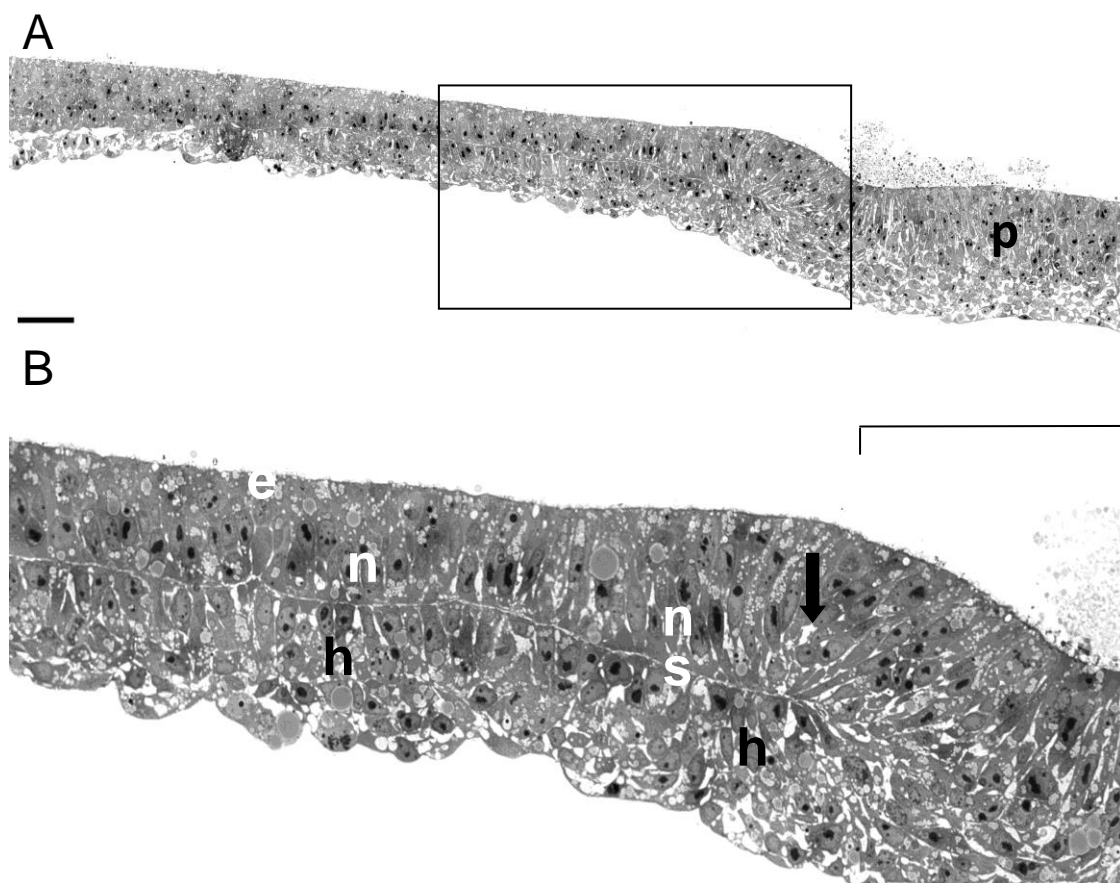


Abbildung 2: medianer Sagittalschnitt eines Hühnerembryos Stadium 5 (A), p Primitivstreifen, B Vergrößerung von A, e Neuroektoderm, [ Primitivknoten, n Chorda dorsalis, h Hypoblast, s subchordales Mesoderm, ↓ chordoneural hinge. Maßstab 29 µm in A, 10 µm in B

aber in vielen Fällen, besonders im dorsalen Bereich, eine apikobasale Ausrichtung aufweisen (Abb. 2). Im Bereich des Primitivknotens fehlt die Begrenzung durch eine Basalmembran nach dorsal, wie sie zwischen Epiblast und Chorda besteht, und ist durch das Erscheinungsbild von Zellen ersetzt, die nach ventral aus dem Epiblasten heraustreten. Der Punkt des kaudalen Endes der Basalmembran ist in der Regel lichtmikroskopisch gut zu erkennen und entspricht, als chordoneural hinge bezeichnet, der anterioren Begrenzung des Primitivknotens. Der Hypoblast bildet die ventrale Bedeckung des Chordastranges, doch liegt zwischen Hypoblast und Chorda noch eine weitere Zellschicht, die weniger epithelial ausgerichtete Zellen enthält: hier haben die Zellen eine eher abgerundete oder unregelmäßig begrenzte Form und daher einen mesenchymalen Charakter. Diese Zellpopulation entspricht daher dem am Beginn des Ergebnisteils beschriebenen „subchordalen Mesoderm“. Dadurch ergibt sich eine Zweischichtung des axialen Mesoderms, wobei die Abgrenzung zwischen subchordalem Mesoderm und epitheliale Chordastrang weniger deutlich erscheint als die Abgrenzung zwischen Chordastrang und Neuroektoderm.

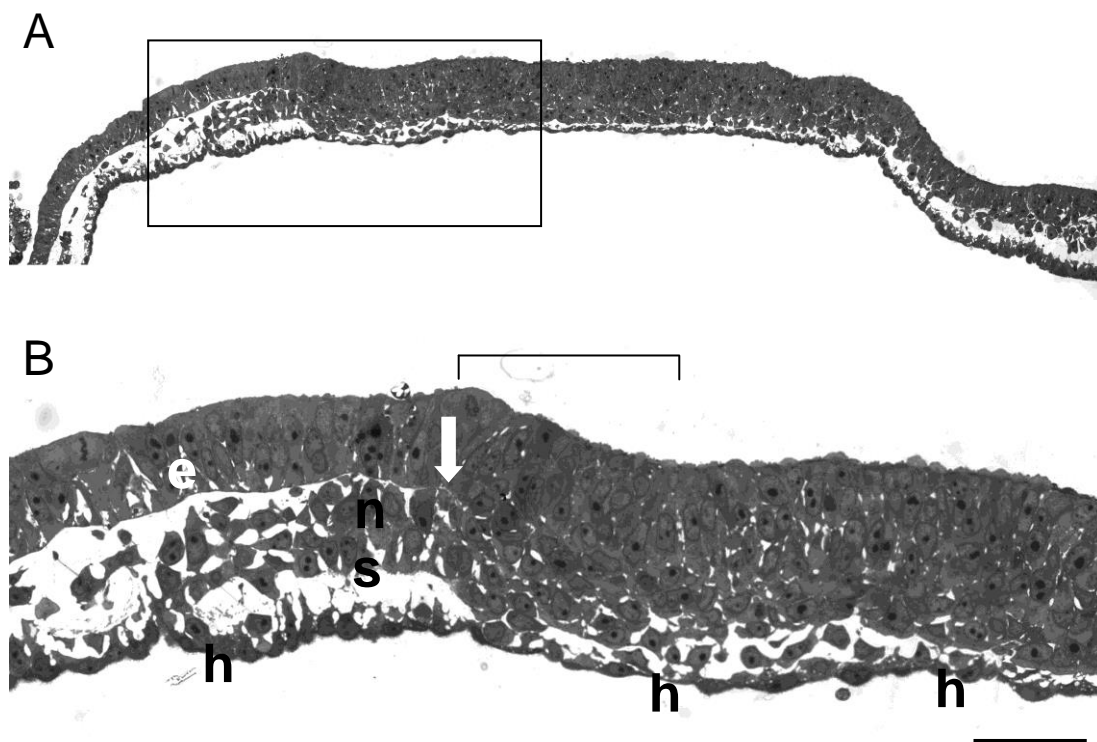


Abbildung 3: Sagittalschnitt eines Schweineembryos im Stadium 5 medial in der Chorda, [ Primitivknoten, B Vergrößerung von A, n Chorda dorsalis, e Neuroektoderm, h Hypoblast, ↓ chordoneural hinge, s subchordales Mesoderm, Maßstab in A

Beim Schwein ist eine vergleichbare Schichtung erkennbar, dorsal die von einer Basalmembran begrenzte Schicht des Neuroektoderms, darunter weist das axiale Mesoderm im frühen Stadium 5 ebenfalls eine mehrschichtige Anordnung auf, d.h. dorsal die epitheliale Konfiguration des Chordafortsatzes und ventral eine eher mesenchymale, mehrheitlich noch rundlich und wenig differenzierte Zellschicht (Abb. 3), das subchordale Mesoderm; ventral ist diese Zellschicht von Hypoblast bedeckt.

Der Primitivknoten ist im Sagittalschnitt durch die Struktur des *chordoneural hinge* nach anterior abgegrenzt. Der Hypoblast unterhalb der Chorda erscheint dabei stellenweise bereits hochprismatisch.

Beim Kaninchen ist, wie in Abb. 4 A und B erkennbar, die Chorda im Stadium 5 bereits von der Bodenplatte des Neuroektoderms abgegrenzt. Der Knoten und auch die noch recht kurze Chorda sind auf der ventralen Seite von Hypoblast bedeckt. Die verschiedenen Schichten des axialen Mesoderms sind beim Kaninchen nicht so deutlich ausgeprägt wie beim Schwein. Da das subchordale Mesoderm im frühen Stadium 5 nur

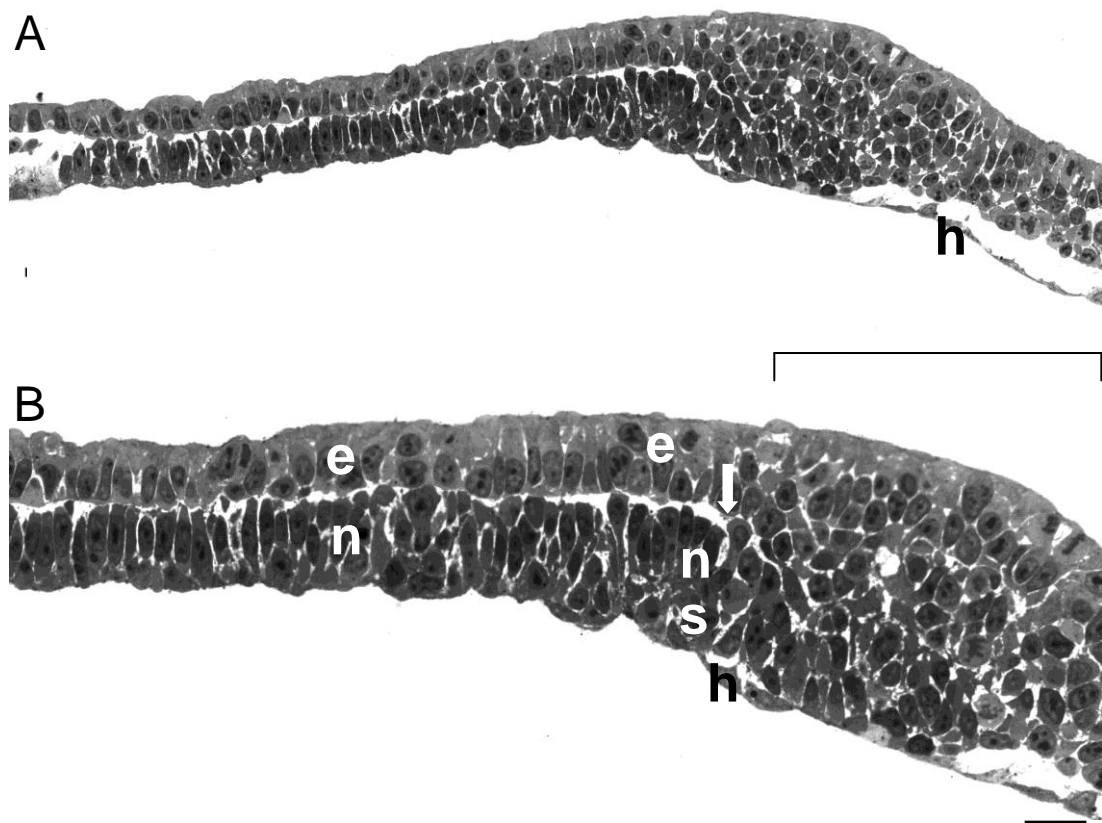


Abbildung 4: Sagittalschnitt eines Kaninchenembryos Stadium 5, B Vergrößerung von A, e Neuroektoderm, n Chorda dorsalis, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, [ Primitivknoten, ↓ chordoneural hinge, Maßstab in A 40 µm, in B 25 µm.

aus wenigen Zellen besteht, ist die Abgrenzung des subchordalen Mesoderms vom posterior angrenzenden Primitiv-streifenmesoderm mitunter schwierig (Abb. 5 C). Die

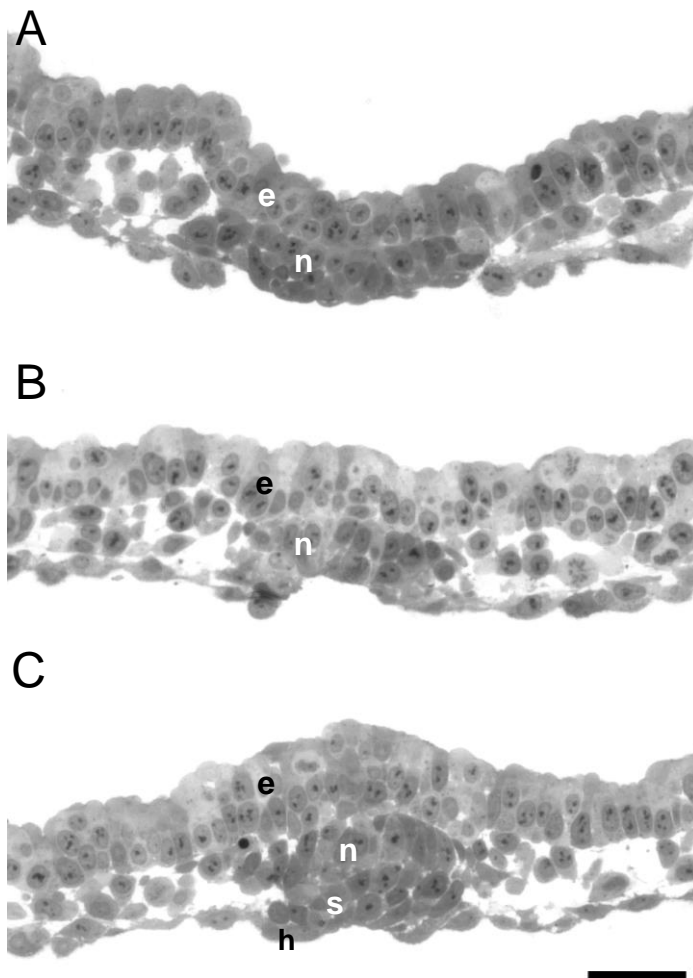


Abbildung 5: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos im Stadium 5 A Schnitt am anterioren Ende der Chorda, B Schnitt im mittleren Bereich der Chorda, C Schnitt knapp anterior des Primitivknotens, e Neuroektoderm, n Chorda dorsalis, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, Maßstab 10  $\mu$ m

Chorda imponiert als einschichtig epithelial differenzierter Zellstrang, der eine Platte bildet, deren ventrale Oberfläche frei liegt. In einigen Individuen zeigt sie im Querschnitt eine ventral konkave Wölbung (vgl. Abb. 5), im hinteren Drittel der Chorda finden sich dagegen mehrere Schichten, die epitheliale Anordnung erscheint weniger streng. Typisch beim Kaninchen ist die eher prismatische Form der Chordazellen im anterioren Bereich, die im vorderen Drittel oft enger von Mesoderm umschlossen sind, als in weiter posterior gelegenen Bereichen (Abb. 5 vgl. A und B). Darüber hinaus zeigen sich im Verlauf der anterior-posterioren Körperachse deutliche Unterschiede: Die ventrale Bedeckung der

Chorda ist nicht kontinuierlich ausgebildet (Abb. 5 A und B vs. C), nur in posterioren Abschnitten findet sich subchordales Mesoderm, teilweise auch Hypoblast. Vor allem im anterioren Bereich ist die Hypoblastbedeckung deutlich rarefiziert, während die knotennahen Bereiche noch fast durchgehend bedeckt sind. Chordazellen mit einer ventral freien Oberfläche tragen Zilien, die bereits lichtmikroskopisch zu erkennen sind (Abb. 6). Der Knoten ist von Hypoblast bedeckt und zeigt daher keine Zilien. Der Hypoblast zeigt eine etwas variable Morphologie, seine Zellen erscheinen entweder flach ausgezogen oder rundlich und tragen kurze Zilien auf ihrer Oberfläche, die sich

lichtmikroskopisch allein durch ihre Länge und größere Anzahl gut von den Zilien der Chordazellen, die weniger dicht stehen, differenzieren lassen. Die Kerne der Hypoblastzellen erscheinen weniger stark gefärbt als die Kerne der Chordazellen und der Ektodermzellen (Abb. 4, die mit h gekennzeichneten Zellen zeigen einen helleren Zellkern).

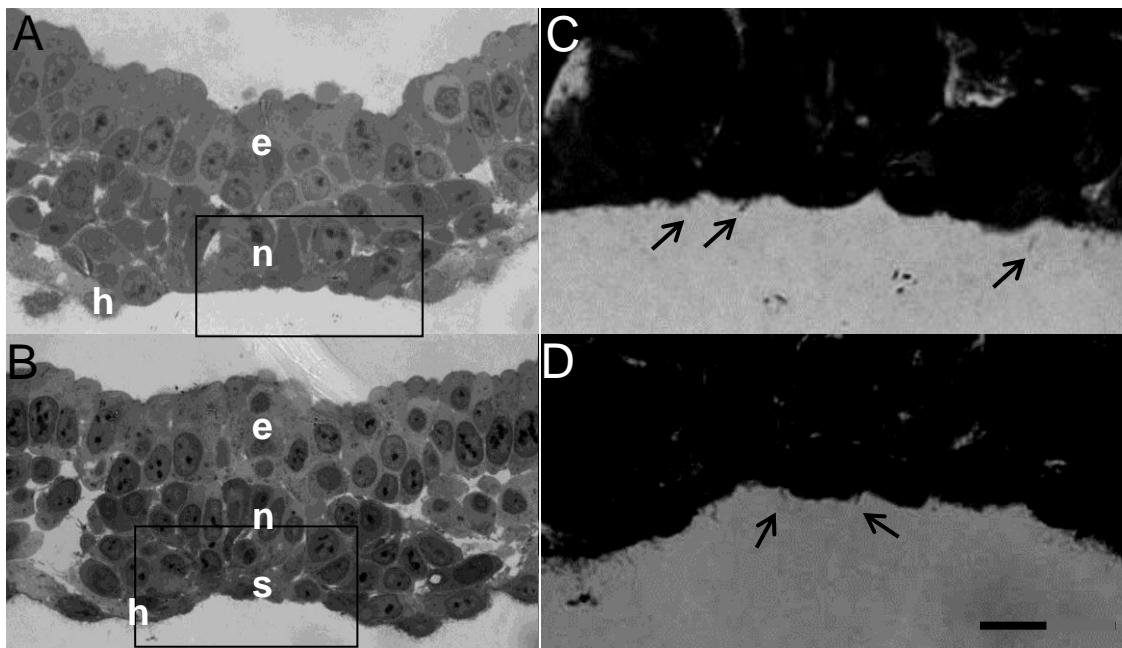


Abbildung 6: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos Stadium 5, A im anterioren Bereich der Chorda, B im posterioren Chordabereich. C Vergrößerung von A, Unterbelichtung zur Darstellung der Zilien, D Vergrößerung von B, Unterbelichtung. Ein paar Zilien → sind zu erkennen, h Hypoblast, n Chorda, e Ektoderm, s subchordales Mesoderm, Maßstab in A und B 10 µm, in C und D 5 µm.

Bei der Maus hat der Embryo im entsprechenden Stadium eine andere Form als die bisher besprochenen Spezies: statt einer flachen Keimscheibe hat sich der becherförmige sogenannte Eizylinder ausgebildet. Der Primitivknoten befindet sich dabei am unteren (sog. distalen) Pol des Eizylinders. Primitivstreifen und Chorda sind in divergierende Richtungen angeordnet; der Primitivstreifen liegt zwischen Primitivknoten und dem einen (posterioren) Rand des Eizylinders, der Chordafortsatz erstreckt sich vom Knoten aus in Richtung des anderen (anterioren) Randes. Bereits bei Lupenvergrößerung ist in der Nähe des Knotens eine kleine Einziehung zu sehen, die den posterioren Abschnitten der Chorda entspricht. Die Chordazellen haben epithelialen Charakter und sind darin den Chordazellen im Kaninchen vergleichbar. Vom Neuroektoderm ist die Chorda mittels Basalmembran abgegrenzt, ventral findet sich anterior des Knotens auf einer kurzen Strecke subchordales Mesoderm. Die ventral frei



liegenden Chordaabschnitte tragen Zilien (Stadium 5 ohne Abb., vgl. Abb. 12, Stadium 6).

### Stadium 6

Beim Huhn gleicht die Chorda im Stadium 6, das bei dieser Spezies durch das Auftreten der Kopffalte charakterisiert ist, weitgehend dem Stadium 5. Die Chorda hat an Länge gewonnen, zeigt hier aber noch eine ähnliche Morphologie (Ohne Abb.).

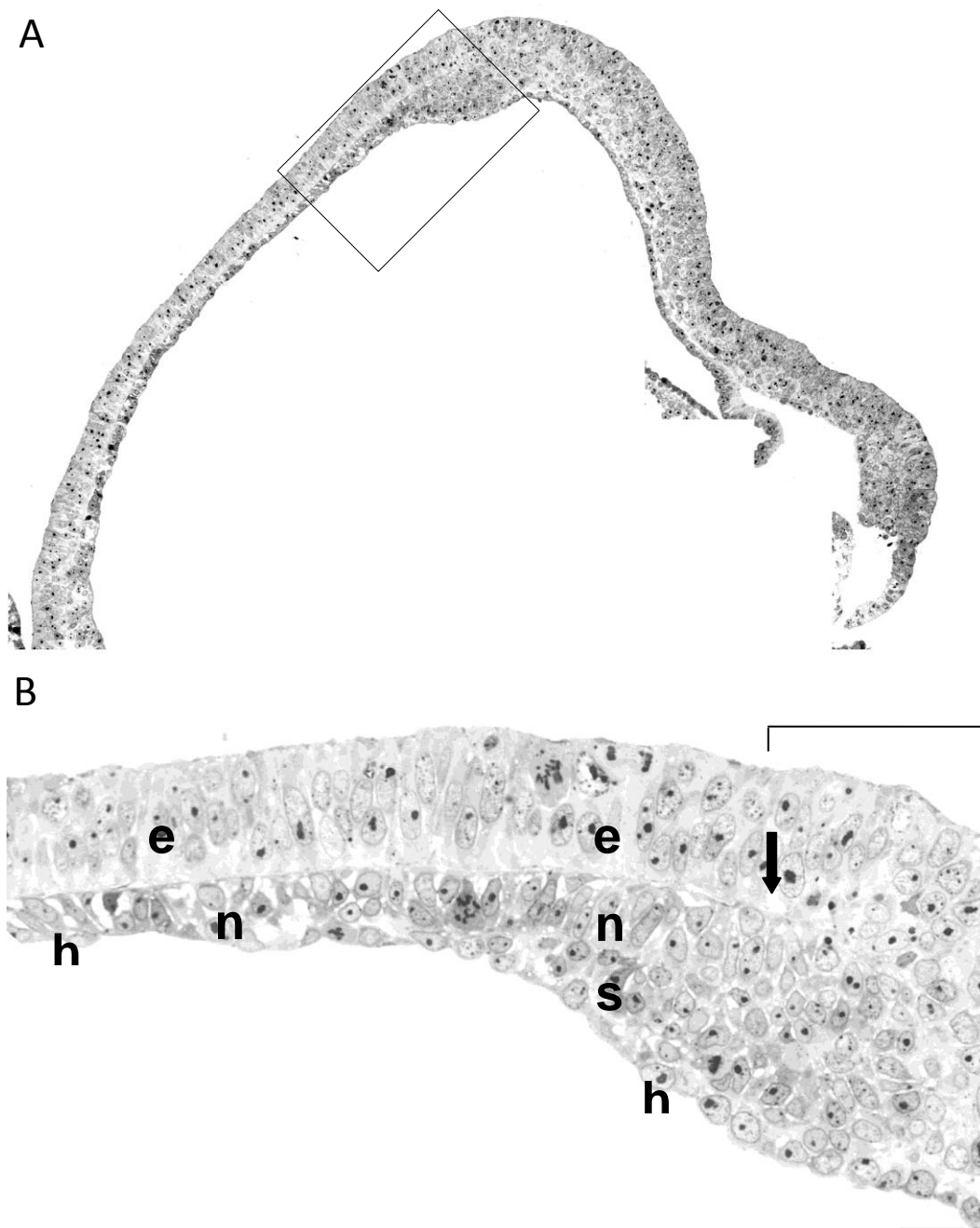


Abbildung 7: A Sagittalschnitt eines Schweineembryos im Stadium 6, median der Chorda, B Ausschnittvergrößerung von A, [ Primitivknoten, n Chorda, e Neuroektoderm, h Hypoblast, s subchordales Mesoderm, ↓ chordoneural hinge, Maßstab in A 42,5  $\mu\text{m}$ , in B 10  $\mu\text{m}$ .

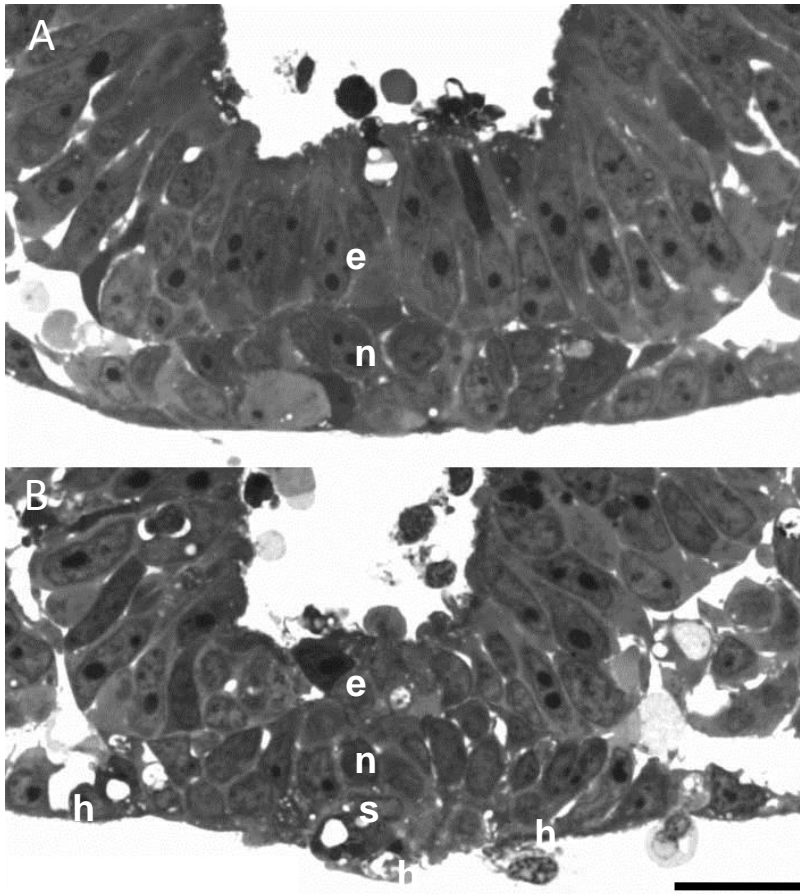


Abbildung 8: Transversalschnitt eines Schweineembryos im Stadium 6 (A), Schnitt im anterioren Bereich der Chorda und B unmittelbar anterior des Knotens, e Neuroektoderm, n Chorda dorsalis, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, Maßstab 5 µm

Auch beim Schwein ähnelt die Morphologie der Chorda im Stadium 6 stark derjenigen im Stadium 5. Subchordales Mesoderm findet sich jedoch nur noch in einem kurzen Abschnitt unmittelbar anterior des Primitivknotens (Abb. 7). Ein Großteil der Chordazellen ist hochprismatisch und im Bereich direkt anterior des Primitivknotens z.T. in mehreren Lagen angeordnet, hier findet sich auch das subchordale Mesoderm. Doch findet sich licht-

mikroskopisch keine freie ventrale Fläche, die Hypoblastbedeckung erscheint bereits lichtmikroskopisch weiterhin durchgängig. In Transversalschnitten zeigt sich im vorderen Bereich des Embryos oft eine eher ovale Form der Chorda, die mit der runden Chordastruktur des Kaninchens (s.u.) nur im posterioren Abschnitt vergleichbar ist: Während die Zellen im Kaninchen hochprismatisch sind und die Chorda ventral konkav figuriert ist, erscheinen die Chordazellen im Schwein oft eher rundlich und haben einen mehr mesenchymalen Charakter. Dadurch wird die laterale Abgrenzung der Chorda erschwert (Abb. 8 B). Es sind allerdings auch wesentlich mehr Zellen in diesem ovalen Strang zu finden, als in der Chorda beim Kaninchen im entsprechenden Stadium.

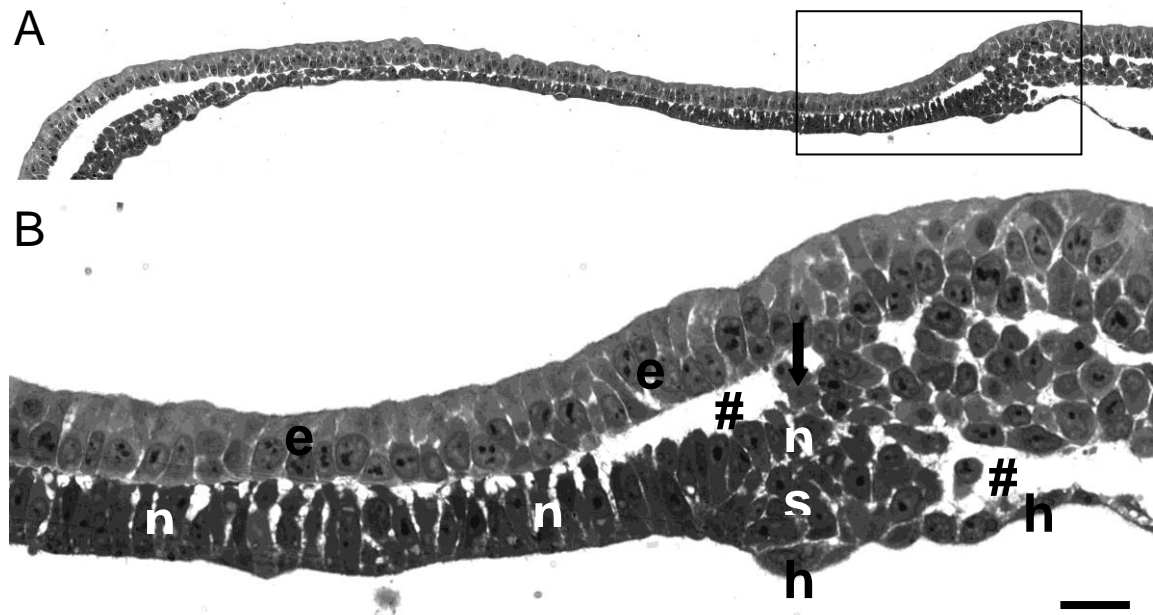


Abbildung 9: Sagittalschnitt eines Kaninchenembryos Stadium 6 (A) median der Chorda, B Ausschnittvergrößerung von A, n Chorda, e Neuroektoderm, h Hypoblast, s subchordales Mesoderm, ↓ chordoneural hinge, # artifiziieller Spalt, Maßstab in A 80 µm, in B 20 µm.

Im Stadium 6 des Kaninchenembryos erscheinen die meisten Chordazellen nicht nur hochprismatisch als Platte organisiert, im vorderen Bereich bilden die Zellen einen ovalen bis runden Zellstrang, die ventral frei liegenden Chordazellen können eine Einziehung im Strang bilden und stehen sich dann halbkreisförmig gegenüber. Am anterioren Ende bildet sich dagegen wieder eine Platte (Abb. 10), die Prächordalplatte grenzt sich von der Chorda ab und besteht aus breiteren und weniger eng aneinander angeordneten Zellen. In der knotennahen Region erscheinen die Zellen dagegen noch rundlich und z.T. in mehr als einer Schicht gelagert, diese zweite Schicht entspricht dem subchordalen Mesoderm. Während die Chorda dorsalis im Stadium 5 noch weitgehend von Hypoblast bedeckt ist, verschwindet diese Bedeckung bis auf die knotennahen Abschnitte, die weiterhin keine freie ventrale Oberfläche zeigen. (Abb. 9)

Die unter anderem auf der Abbildung 9 auffallenden großen Spalten sind als Artefakt zu deuten, zeigen aber dafür anschaulich die scharfe Trennung zwischen Chorda und Neuroektoderm durch dessen Basalmembran.

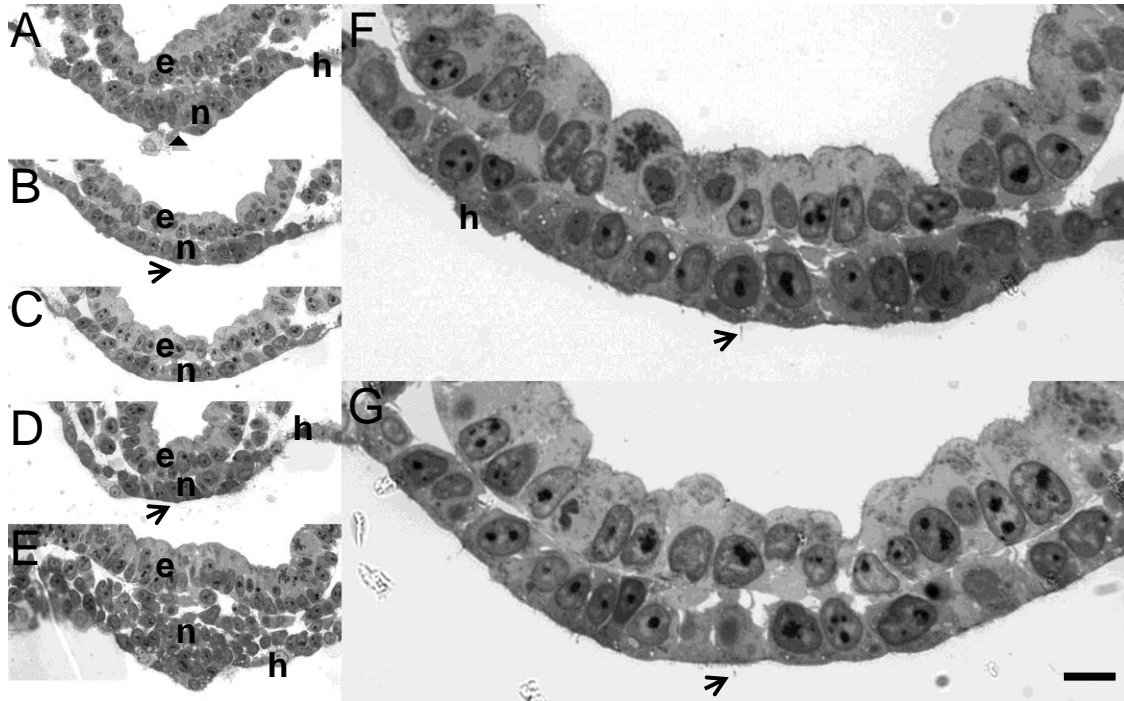


Abbildung 10: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos im Stadium 6, A Schnitt durch den anterioren Bereich der Chorda dorsalis, B-D Chorda in posteriore Richtung verlaufend, E Chorda direkt anterior des Primitivknotens. n Chorda, e Ektoderm, h Hypoblast, ➤ Zilien, in A zeigt sich eine halbkreisförmige Einwölbung der Chorda ▲, F Vergrößerung von B, G Vergrößerung von D, in beiden Vergrößerungen kann man Zilien erkennen. Maßstab in A 65  $\mu\text{m}$ , in B 20  $\mu\text{m}$ .

Beim Menschen (Carnegie-Stadium 8) sind die Chordazellen hochprismatisch und, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, durchgehend von Hypoblast bedeckt. In der Nähe des Knotens tritt ventral der hochprismatischen Zellen der Chorda noch die Zellschicht des subchordalen Mesoderms mit eher rundlichen Zellen auf, Zwischen subchordalem Mesoderm und Chorda dorsalis liegt stellenweise ein schmales Lumen das dadurch auffällt, dass es nur auf einer Seite, der dorsalen, von einer Epithelschicht begrenzt wird.

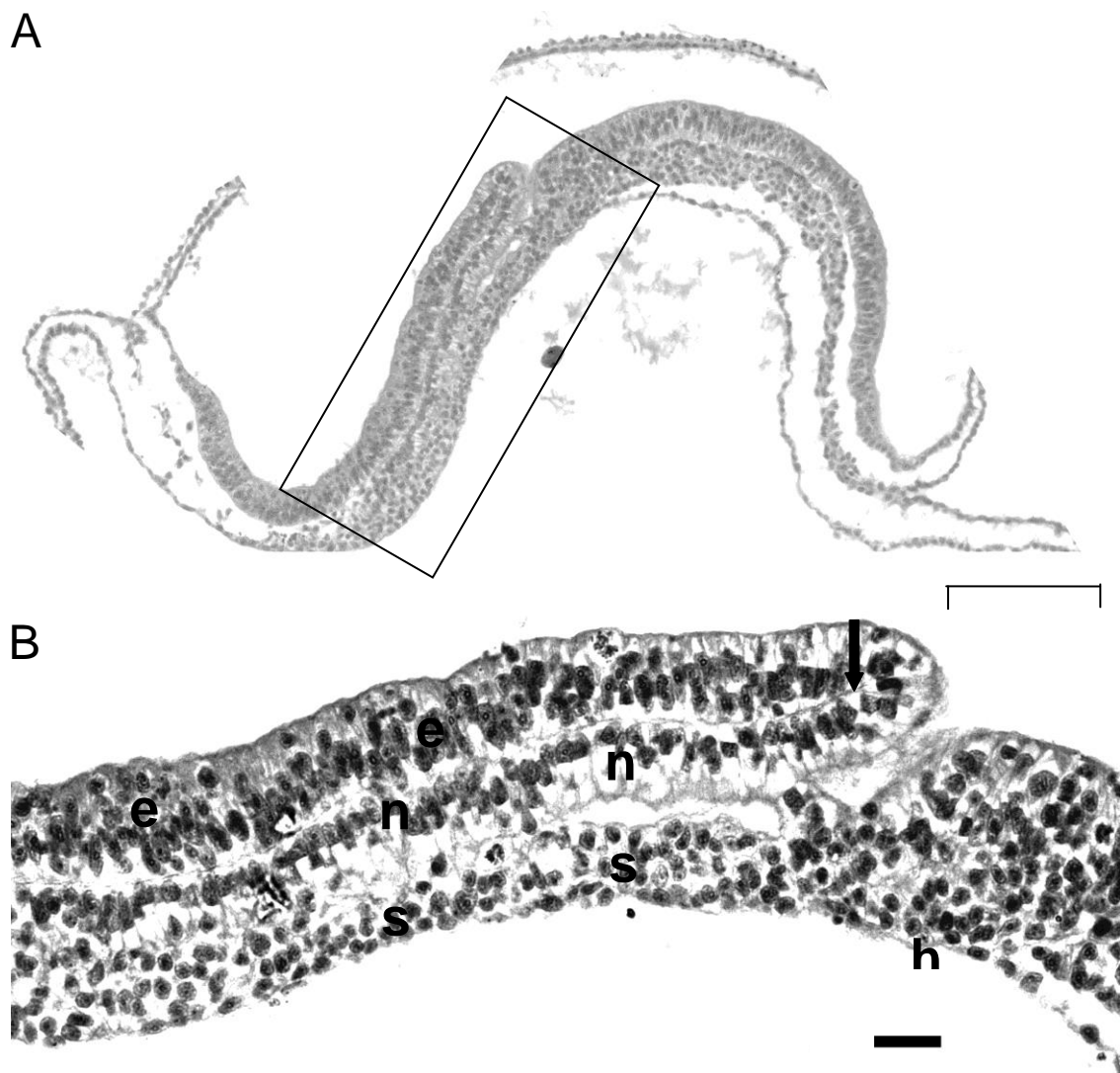


Abbildung 11: medianer Sagittalschnitt eines menschlichen Embryos des Carnegie-Stadiums 8, A Gesamtaufnahme B Vergrößerung von A, [ Primitivknoten, n Chorda, e Neuroektoderm, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, ■ chordoneural hinge, Maßstab in A 27  $\mu\text{m}$ , in B 10  $\mu\text{m}$ .

Der Mäuseembryo weicht durch seine Form auch im Theiler-Stadium 11, entsprechend dem Stadium 6 nach Hamburger und Hamilton, deutlich von den übrigen Spezies ab, indem sich der Eizylinder voll ausgebildet hat und an seinem embryonalen Pol Chorda und Knoten trägt. In diesem Stadium ist der Beginn der Neurulation zu beobachten, die Chorda liegt ventral in der Mittellinie frei und verengt sich nach vorn. Auf der freien Fläche tragen die Zellen einzelne Zilien (Abb. 12), seitlich sind sie mit dem Endoderm verbunden. Die Chordaplatte imponiert breit und rundlich.

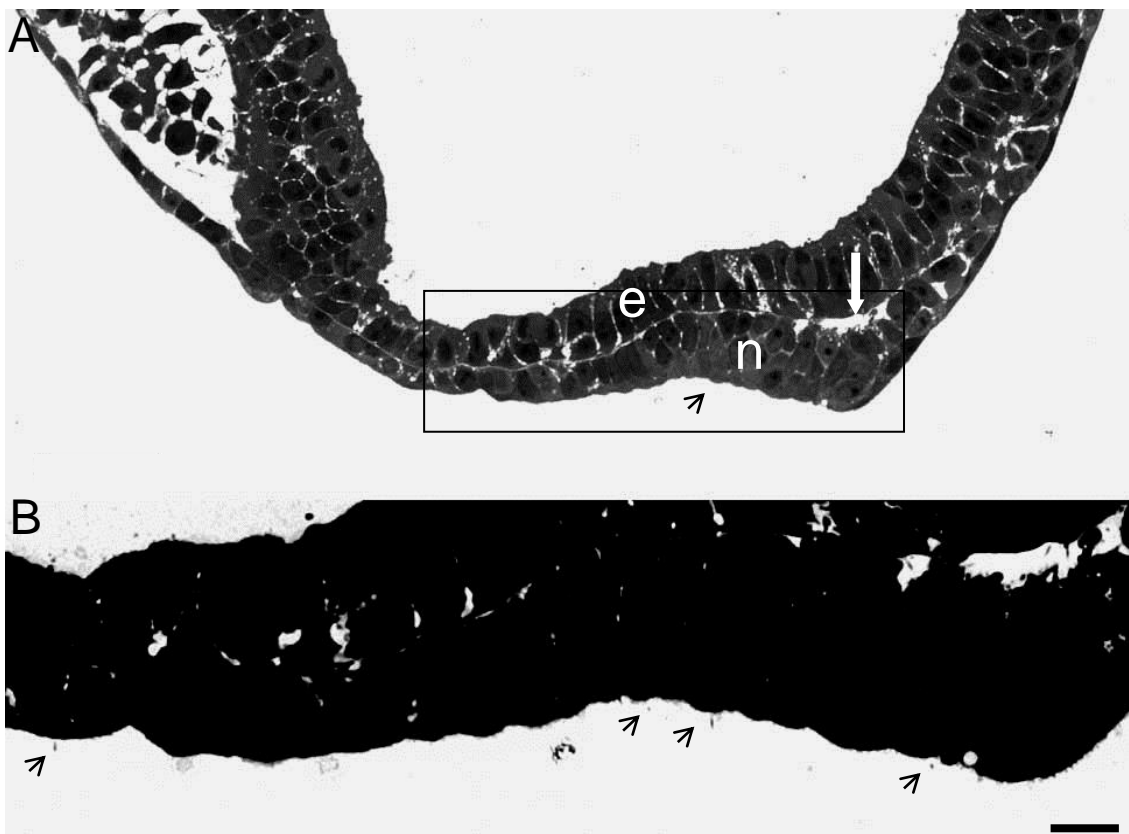


Abbildung 12: Sagittalschnitt eines Mäuseembryos Stadium 6 (A), da der Embryo schräg angeschnitten ist lateral des Primitivknotens, e Neuroektoderm, n Chorda, ↓ chordoneural hinge, Zilien ↗, B Vergrößerung von A, Maßstab in A 11,75 µm in B 5 µm.

### Stadium 7

Der Hühnerembryo im Stadium 7 zeigt eine sehr lange Chorda dorsalis und die ersten drei Somiten. Es bilden sich die Neuralfalten, die allerdings in den hier abgebildeten Sagittalschnitten nicht dargestellt sind. In der Morphologie der Chordazellen und der umgebenden Strukturen sind sich das Stadium 7 und die beiden vorhergehenden Stadien sehr ähnlich. Die Chordazellen erscheinen relativ klein und apikal-basal orientiert (Abb. 13), während sie ventral vom subchordalen Mesoderm und dem Hypoblasten unterlegt

sind (Abb. 13 s und h). Auffällig ist in allen hier beschriebenen Stadien das hohe Epithel des dorsal liegenden Neuroektoderms (Abb. 13 e).

Dies findet sich ähnlich ausgeprägt auch beim Schwein (Abb. 14), nicht jedoch bei den übrigen hier beschriebenen Spezies, die eine wesentlich dünnere Zellschicht (Abb. 15) aufweisen.

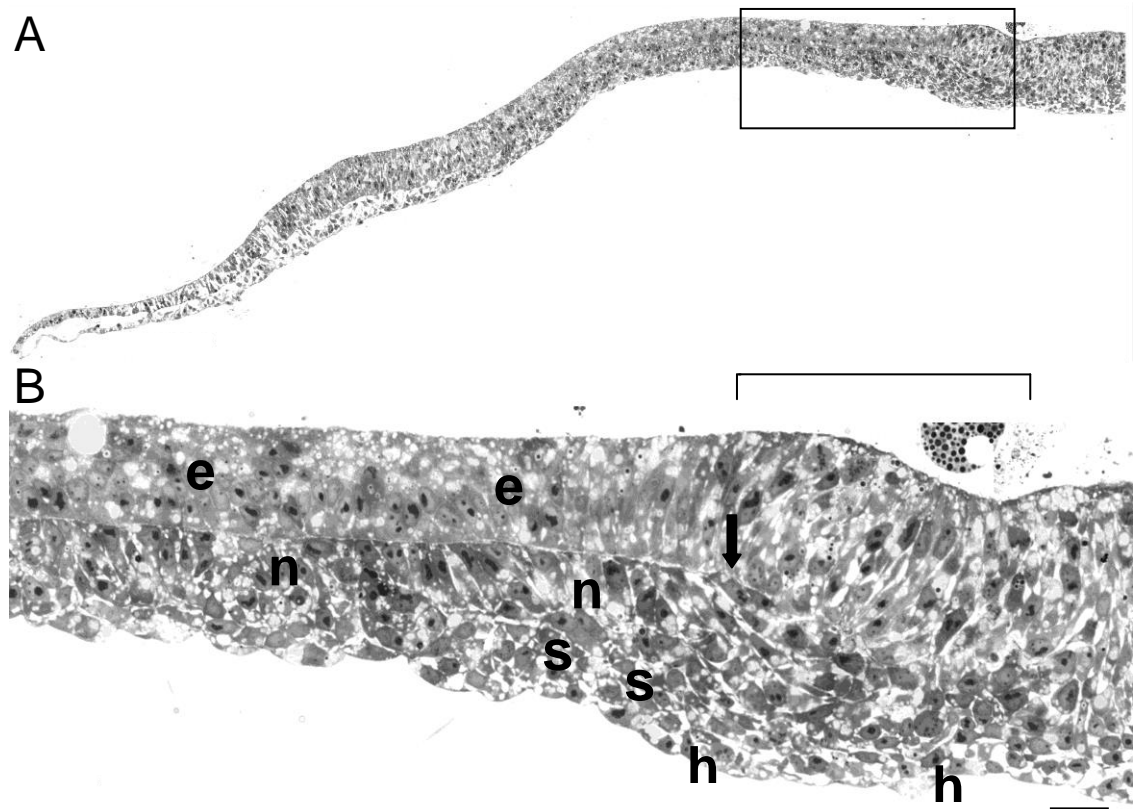


Abbildung 13: medianer Sagittalschnitt eines Hühnerembryos Stadium 7 (A), anteriore Hälfte B Vergrößerung von A, n Chorda, e Neuroektoderm, [ Primitivknoten, h Hypoblast, s subchordales Mesoderm, ↓ chordoneural hinge, Maßstab in A 87 µm in B 20 µm

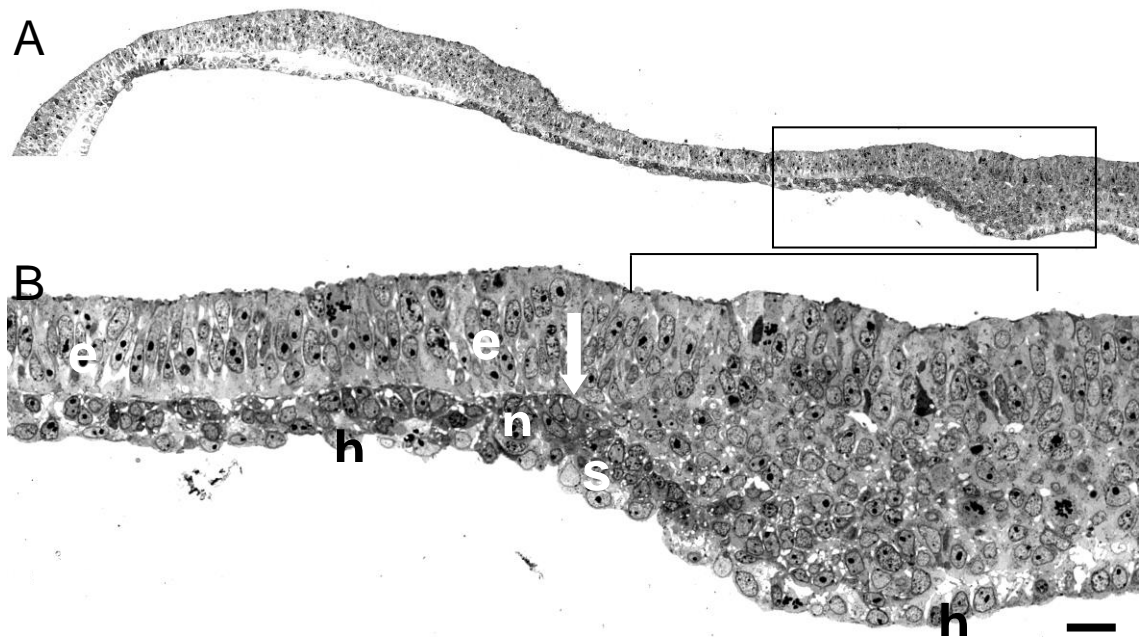


Abbildung 14: Medialer Sagittalschnitt eines Schweineembryos Stadium 7 (A), B Ausschnittsvergrößerung von A, e Neuroektoderm, n Chorda, [ Primitivknoten, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, ↓ chordoneural hinge. Maßstab in A 120 µm, in B 20 µm.

Beim Schweineembryo des Stadiums 7 zeigt die Chorda in ihrem Verlauf oft eine leichte Biegung in der Längsachse, und liegt somit nur in Teilbereichen strikt median. In der Breite der Chorda zeigen sich ebenso Schwankungen wie beim Kaninchen, und auch die Zellform variiert, hier allerdings eher zwischen hochprismatisch und rundlich (Abb.14 n). Die Chorda ist weiterhin von Hypoblast bedeckt. Die unterhalb der Chorda liegenden Hypoblastzellen unterscheiden sich in ihrer Morphologie von den Hypoblastzellen, die seitlich der Chorda liegen. Die Hypoblastzellen unterhalb der Chorda erscheinen flacher, kompakter und stärker gefärbt, als die weiter lateral gelegenen Hypoblastzellen. Die z.T. sehr flachen Zellen erschweren die Identifikation des Hypoblasten, da die Zellkerne der zu beurteilenden Zellen häufig erst in Nachbarschnitten angeschnitten sind.

Das Kaninchen zeigt im Stadium 7 ebenso wie das Schwein eine Längsbiegung der Chorda, doch fallen diese Abweichungen von der Medianlinie weniger stark aus.

Die morphologischen Charakteristika des Stadium 6- Kaninchens sind im Stadium 7 auszumachen, wobei die Chordazellen im mittleren Bereich teilweise eher kubisch oder flach imponieren (Abb. 15 Bild B, n), während sie nach anterior und posterior wieder höher werden. Abgesehen davon zeigt die Chorda hier auch in weiteren Aspekten eine



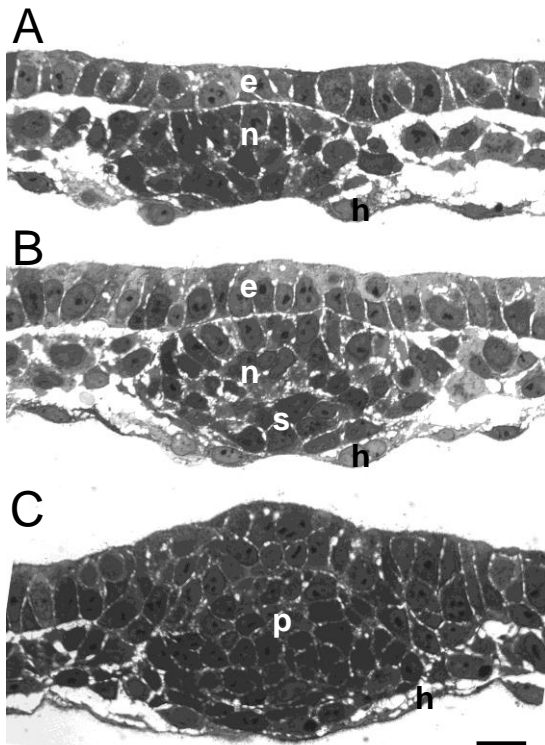


Abbildung 15: Transversalschnitte eines Kaninchenembryos des Stadiums 7 (A) Schnitt im anterioren Bereich der Chorda, n Chorda, e Neuroektoderm, h Hypoblast B) im mittleren Bereich der Chorda, s subchordales Mesoderm C) im Bereich des Knotens, p Primitivknoten. Maßstab 20  $\mu$ m

auffällige Variabilität. Die meisten Zellen zeigen eine hochprismatische Form und sind nebeneinander angeordnet. Bleibt die Chorda als einschichtiger Zellstrang bestehen, so verengt sie sich in rostraler Richtung und wird am anterioren Ende wieder breiter. Der Knoten bleibt weiterhin von Endoderm oder Hypoblast bedeckt (Abb. 15 Bild C), während die Chorda freiliegt und Zilien trägt (Abb. 15 Bild A). Lichtmikroskopisch sind Zilien auch im stellenweise vorhandenen Lumen innerhalb der Chorda zu finden (ohne Abb.).

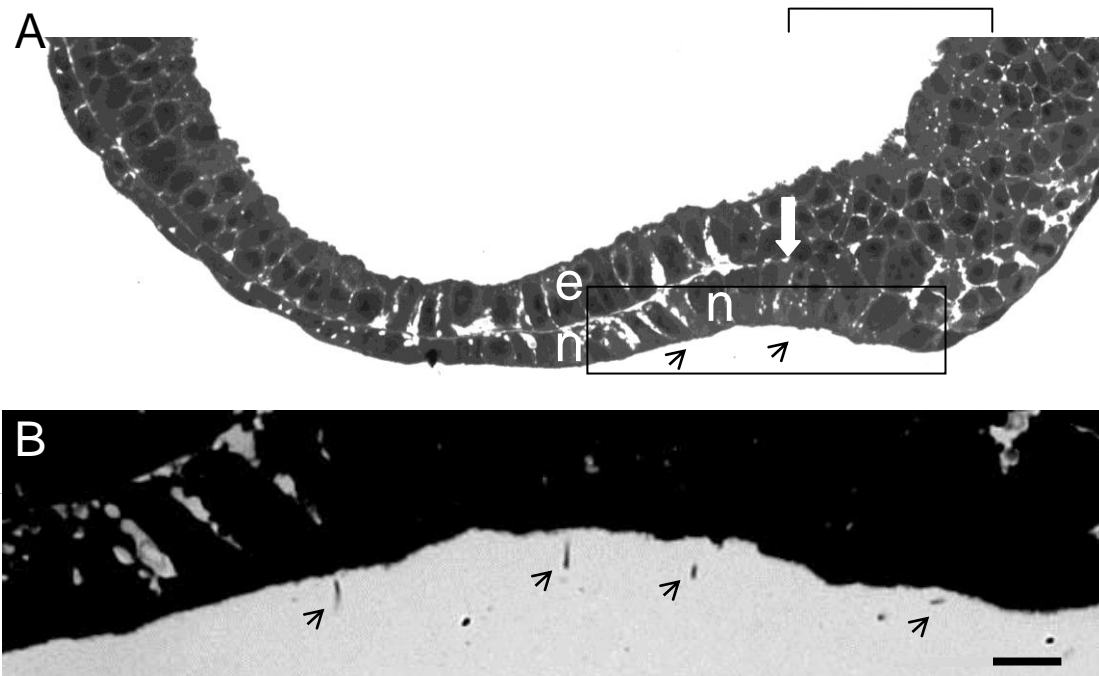


Abbildung 16: Sagittalschnitt eines Mäuseembryos Stadium 7(A), [ Primitivknoten, e Neuroektoderm, n Chorda, ▾ chordoneural hinge, Zilien ↗ , B Vergrößerung von A, Maßstab in A 10  $\mu$ m, in B 3,5  $\mu$ m.

Bei der Maus entstehen im Stadium 12 nach Theiler die ersten Somiten, gleichzeitig beginnt der Embryo sich zu drehen. Die Neuralfalten erscheinen in diesem Stadium als prominenteste Struktur, der Knoten liegt mittlerweile recht weit kaudal im Embryo. Auf der ventral freiliegenden Chorda liegen motile Zilien (Abb. 16).

### 3.2 Dyneinexpression im Kaninchen Stadium 4-7

Im Stadium 4 beginnt die Expression der Dyneine 5, 9 und 11 im Primitivknoten und ist zunächst als schwache Blaufärbung erkennbar. In den Stadien 5 und 6 ist lediglich die Chorda auf einem Großteil ihrer Länge angefärbt, im Stadium 7 geht die Genexpression stark zurück, es findet sich nur eine diskontinuierliche und schwächere Färbung ausschließlich im mittleren Bereich der Chorda, gemessen an der Längsachse des Embryos. Die stärkste Expression zeigte das *dynein 9*, das daher nachfolgend als erstes beschrieben wird; *dynein 11* zeigte eine ähnlich starke Intensität wie *dynein 9*, während das *dynein 5* in allen Versuchen die schwächste Farbreaktion aufwies. Im Folgenden wurde eine bei 200-facher Vergrößerung eindeutig unterscheidbare blaue Färbung der Zellen als positive Reaktion definiert, mit Ausnahme einer als Ausblutung gedeuteter Färbung in Abb. 28, Näheres wird in der Diskussion erläutert.

#### 3.2.1 cDNA-Sequenzen

Die untersuchten Dynein-Sequenzen wurden so gewählt, dass eine hohe Übereinstimmung mit den gleichen Dyneinketten anderer Spezies bestand, die einzelnen Sequenzen jedoch nicht mit den Ketten anderer Dyneine übereinstimmte.

Bei *dnah 5* zeigte sich so eine über 60 %ige Übereinstimmung mit dem Gen für *dnah5* bei Walross, europäischem Iltis, Pfeifhase, ebenso wie bei Mensch, Rind, Schwein und Maus. In der Gensequenz lag die 656 bp-lange Sequenz zwischen den Basenpaaren 1254 und 1910.

Die Sequenz für *dnah9* beim Kaninchen zeigte eine über 90 %ige Übereinstimmung mit den Gensequenzen von Mensch, Rind und Maus, sowie eine über 80 %ige Übereinstimmung mit den Sequenzen von Orang-Utan, Koboldmaki und Pfeifhase. Die Sequenz mit einer Länge von 914 bp erstreckt sich in der Gensequenz zwischen den Basenpaaren 1157 und 2066.

Bei der Sequenz des *dnah11* zeigt sich eine über 80 %ige Übereinstimmung mit den entsprechenden Gensequenzen bei Nashorn, Mausohrfledermaus und Pfeifhase, sowie eine 68 % bzw. 70% ige Übereinstimmung mit den Sequenzen bei Rind und Schwein. Die von uns untersuchte Sequenz zeigte eine Länge von 777 bp, und erstreckte sich in der Gensequenz zwischen den Basenpaaren 2106-2783.

### 3.2.2 Expressionsmuster

#### Dynein 9

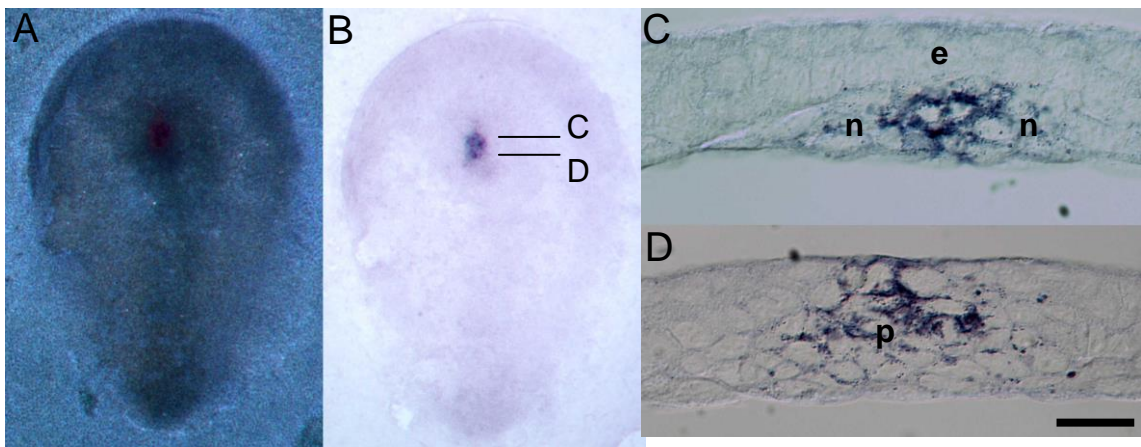


Abbildung 17: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 4-Embryos nach ISH für *dynein 9*, C Transversalschnitte des Embryos am anterioren Ende der Färbung und D im Bereich des Primitivknotens, e Ektoderm, n Chorda dorsalis, p Primitivknoten Maßstab in A und B 0,3 mm, in C und D 20  $\mu$ m.

Im Stadium 4 zeigt *dynein 9* eine schwache Expression im Primitivknoten (Abb. 17 A und B), bei Embryonen des fortgeschrittenen Stadiums 4 war die Färbung intensiver als bei jüngeren Individuen. In Schnittserien durch die Expressionsdomäne ist erkennbar, dass sich die Färbung für *dynein 9* weitgehend auf die Zellschichten oberhalb des Hypoblasten beschränkt, sich aber auch nicht auf das darüber liegende Ektoderm erstreckt (Abb. 17 C). In kaudal gelegenen Schnitten ist die Färbung median auch in der obersten Zellschicht zu finden, die nach ventral Zeichen der EMT zeigen: hier liegt die Färbung im Bereich des Primitivknotens (Abb. 17 D), im unmittelbar anterior angrenzenden Teil der Expressionsdomäne liegt die Färbung in der entstehenden Chorda dorsalis (Abb. 17 C).

Im Stadium 5 zeigt das *dynein 9* eine starke und spezifische Farbreaktion im Bereich der Chorda und des knotennahen Bereiches, der noch mehrere Zellschichten enthält. Die vordersten Chordaabschnitte sind jedoch nicht angefärbt (Abb. 18 A und B), wie in Schnitten zu erkennen ist, reicht die Chorda bereits bis kurz vor den anterioren Rand der Keimscheibe (hier ohne Abbildung).

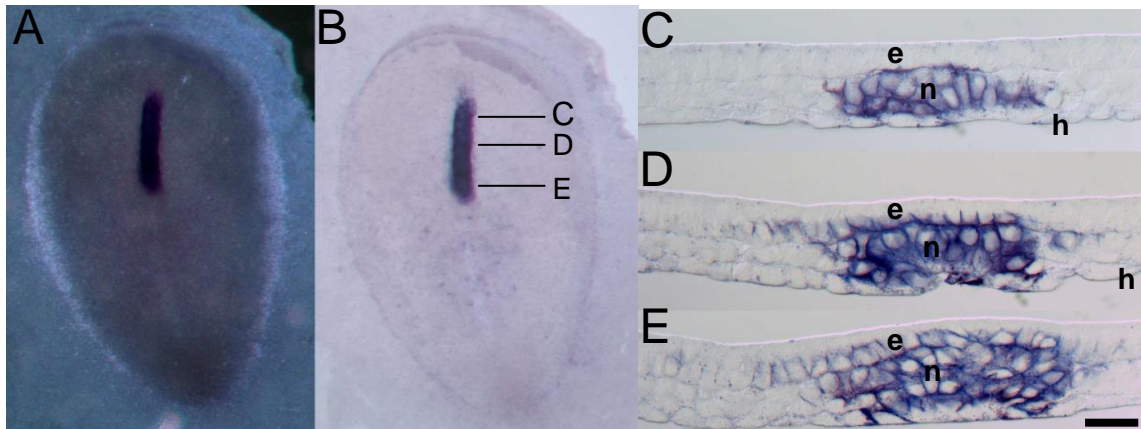


Abbildung 18: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Embryos Stadium 5 nach ISH für *dynein 9*, C Transversalschnitte eines Stadium 5 Embryos nach ISH im anterioren Bereich der Chorda, Ausparung des seitlichen Mesoderms, keine spezifische Färbung des Ektoderms und des Hypoblasten, D Transversalschnitt im mittleren Bereich der Chorda, E Transversalschnitt anterior des Knotens. e Ektoderm, n Chorda dorsalis, h Hypoblast. Maßstab in A und B 0,22 mm, in C-E 20 µm.

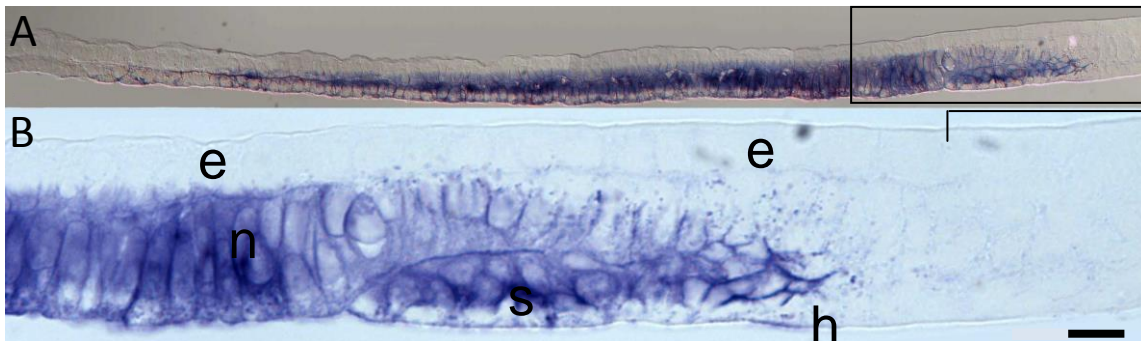


Abbildung 19: Sagittalschnitt eines Embryos im Stadium 5 nach ISH für *dynein 9* (A), B Vergrößerung von A, [ Primitivknoten, e Neuroektoderm, n Chorda, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, Maßstab in A 33 µm, in B 10 µm.

Im Bereich unmittelbar vor dem Knoten treten zwei gefärbte Zellschichten auf, deren eine relativ niedrig ist, ventral liegt und dem oben beschriebenen subchordalen Mesoderm entspricht. (Abb. 19 Bild B, s). Die andere (dorsale) Zellschicht entspricht dagegen den epithelialen Chordazellen (Abb. 19 Bild B, n).

Im Stadium 6 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Färbung nicht über die ganze Chorda erstreckt. Die Färbung fällt anterior schwächer aus als im hinteren Abschnitt der Chorda, insgesamt ist die Farbreaktion weniger intensiv als im Stadium 5. (Abb. 20 A

und B). Die Chorda wird etwas anterior des Knotens stark angefärbt (Abb. 19 B), ebenso das subchordale Mesoderm (Abb. 20 C). Dabei beschränkt sich die Expression auf die Zellen der Chorda dorsalis und des subchordalen Mesoderms. In kraniale

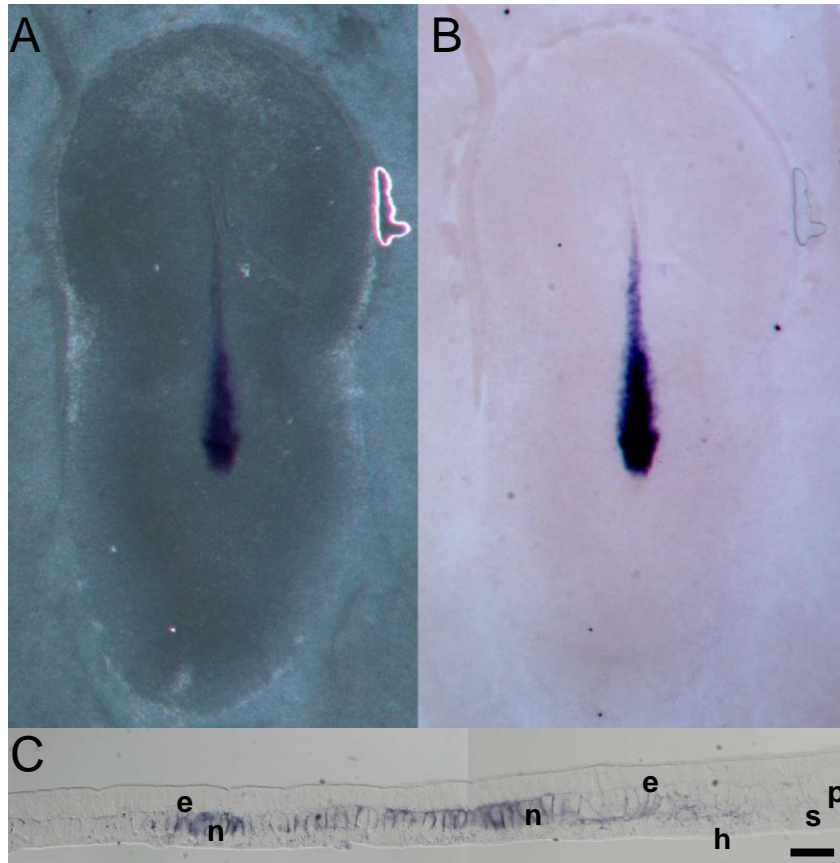


Abbildung 20: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 6-Embryos nach ISH, deutliche Farbreaktion im Bereich der Chorda, C medianer Sagittalschnitt eines Embryos mit ungefärbtem Ektoderm und Hypoblasten, keine Färbung des Knotens. e Ektoderm, n Chorda dorsalis, h Hypoblast, s subchordales Mesoderm, p Primitivknoten. Maßstab 0,166 mm in A und B, 20  $\mu$ m in C.

Richtung schwächt sich die Färbung ab und konzentriert sich vor allem in den zentral der Chorda liegenden Zellen, um ungefähr auf halber Länge der Chorda vollständig zu verschwinden. Ektoderm und Endoderm bzw. Hypoblast zeigen keine Farbreaktion und somit keine Hinweise auf eine Expression von *dynein 9*.

Im Stadium 7 ist die Expression stark rückläufig und nicht auf ganzer Länge kontinuierlich ausgeprägt. Das *dynein 9* zeigt eine schwache Expression knapp anterior des Primitivknotens, schwerpunktmäßig in der Chorda (Abb. 21 A und B), stellenweise findet sich aber auch eine leichte Färbung im darüber liegenden Neuroektoderm, bzw. in einzelnen Hypoblastzellen. Bei dem hier abgebildeten Individuum (Abb. 21 C) finden sich auch extraembryonal und flächig im kaudalen Bereich des Embryos Farbsignale. Doch sind diese zu schwach, um sie in den Schnitten sichtbar zu machen und sind als unspezifische Reaktion zu deuten.

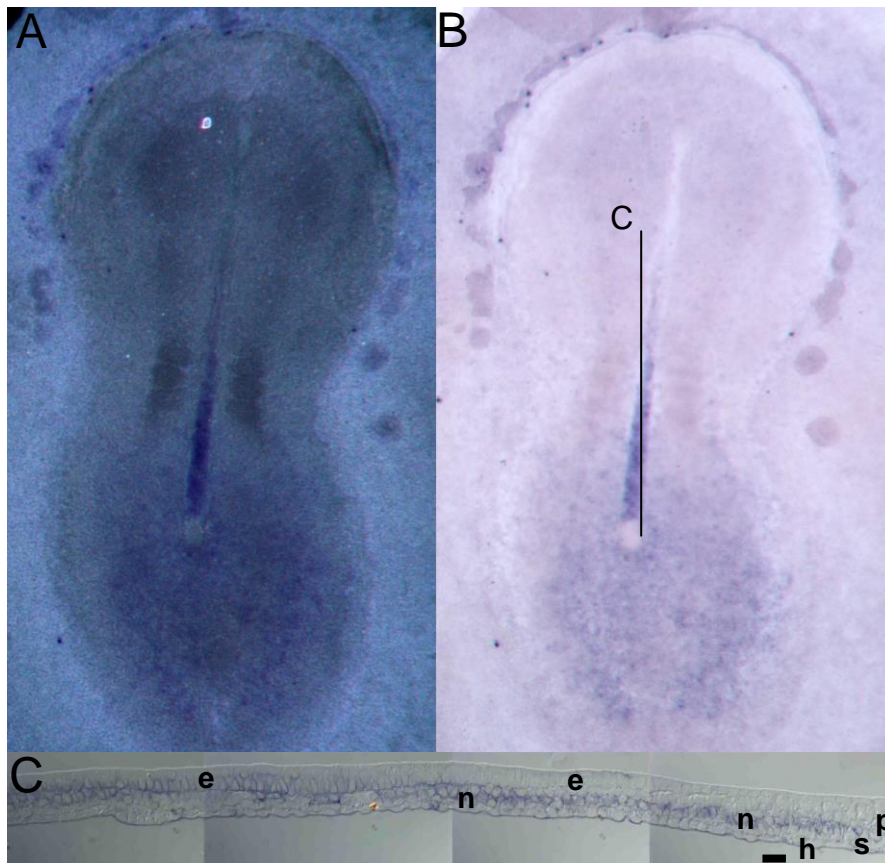


Abbildung 21: Dunkel- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 7-Embryos nach ISH für Dynein 9, Färbung im hinteren Teil der Chorda, C Sagittalschnitt des Embryos, e Ektoderm, n Chorda dorsalis, s subchordales Mesoderm, h Hypoblast, p Primitivknoten. Maßstab in A und B 0,095 mm, in C 20  $\mu$ m.

### Dynein 11

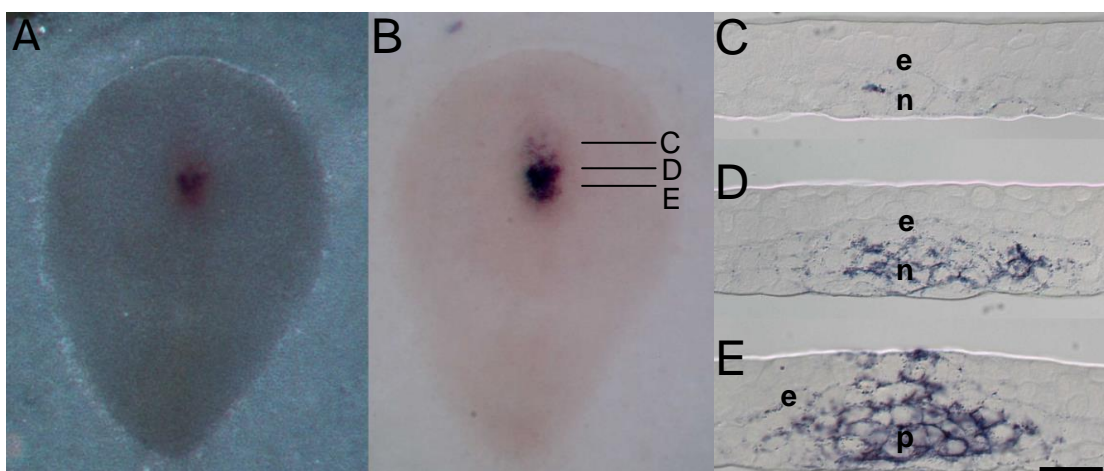


Abbildung 22: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 4-Embryos nach ISH für *dynein 11*, C Transversalschnitt anteriores Ende des gefärbten Areals, D mittlerer Bereich der Färbung, E kaudales Ende mit Anfärbung oberer extrachordaler Zellen, Beginn des Primitivknotens, e Ektoderm, n Chorda dorsalis, p Primitivknoten. Maßstab in A und B 0,18 mm, in C-E 20  $\mu$ m.

Im Stadium 4 fand sich eine selektive Expression des *dynein 11* ausschließlich im Bereich des Primitivknotens (Abb. 22 Bild A und B). In den Transversalschnitten (Abb.22 Bild C bis E) findet sich ein ähnliches Expressionsmuster wie beim *dynein 9* (Abb. 17).

Dabei ist im posterioren Knotenbereich zu erkennen, dass eine Schicht zwischen Epiblast und Hypoblast angefärbt ist (Abb. 22 Bild D und E), sie entspricht einer Genexpression im Knoten und einer kurzen Zone im Epiblasten mit Verbindung in tieferen Schichten des Knotens, nicht jedoch im Hypoblasten oder im seitlichen Ektoderm (Abb. 22 C und D), sondern nur (Abb. 22.E) in den Zellen des entstehenden Chordafortsatzes. Auch hier findet sich also eine auf die Chorda beschränkte Dyneinexpression, die sich nicht auf umliegende Zellen anderer Strukturen erstreckt.

Beim *dynein 11* reicht die Färbung im Stadium 5 recht nah an den Knotenbereich heran (Abb. 23 Bild A und B), das Neuroektoderm ist auch hier ungefärbt (ohne Abbildung),

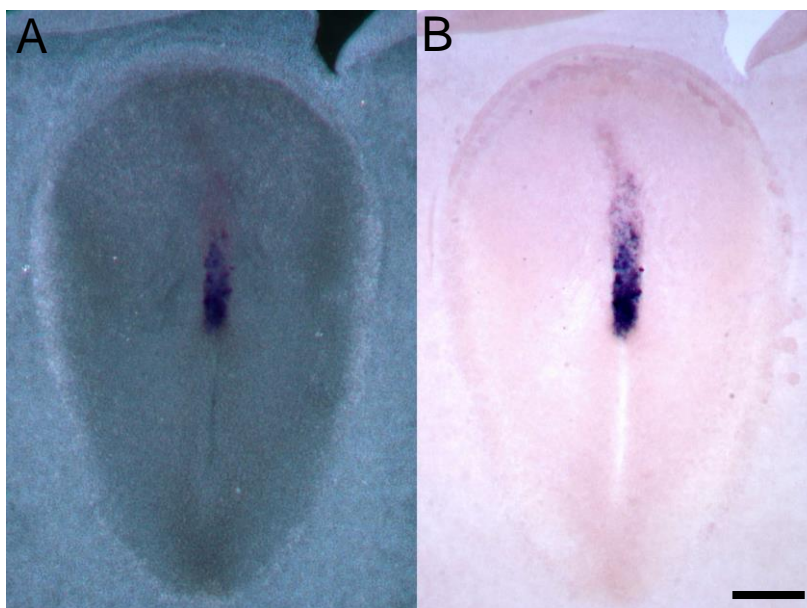


Abbildung 23: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 5 Embryos nach ISH für *dynein 11*, Färbung im kaudalen Bereich der Chorda, Maßstab 0,25 mm.

der Hypoblast dagegen ist nicht eindeutig zu beurteilen, Die Färbung erscheint weniger ausgeprägt als beim *dynein 9* und verliert im anterioren Bereich auch früher an Intensität, ohne jedoch so abrupt wie beim *dynein 9* vollständig zu verschwinden, so finden sich in den

anterioren Chordaarealen immer noch einzelne gefärbte Zellen.

Die Farbreaktion lässt beim *dynein 11* im Stadium 6 nicht so stark nach wie beim *dynein 9*, doch ist auch hier eine rückläufige Expression im Vergleich zum Stadium 5 zu erkennen. Im Sagittalschnitt ist zu erkennen, dass die Chordazellen spezifisch

angefärbt sind, ohne dass Signale im darüber liegenden Ektoderm oder dem basal liegenden Hypoblasten erkennbar wären. In medianen Schnitten (Abb. 24 C) lässt sich nahe des Primitivknotens das subchordale Mesoderm als mäßig stark gefärbt nachweisen. Beim *dynein 11* fällt auf, dass die Expression bis fast an den Knoten reicht, doch ist sie in dieser Region auf die Zellschicht der Chorda und das subchordale Mesoderm beschränkt, eine Verbindung der Farbreaktion bis zum Knoten findet sich nicht. Weiter vorn ist die Chorda nach wie vor stark angefärbt, doch nimmt die Farbintensität in anteriore Richtung stark ab.

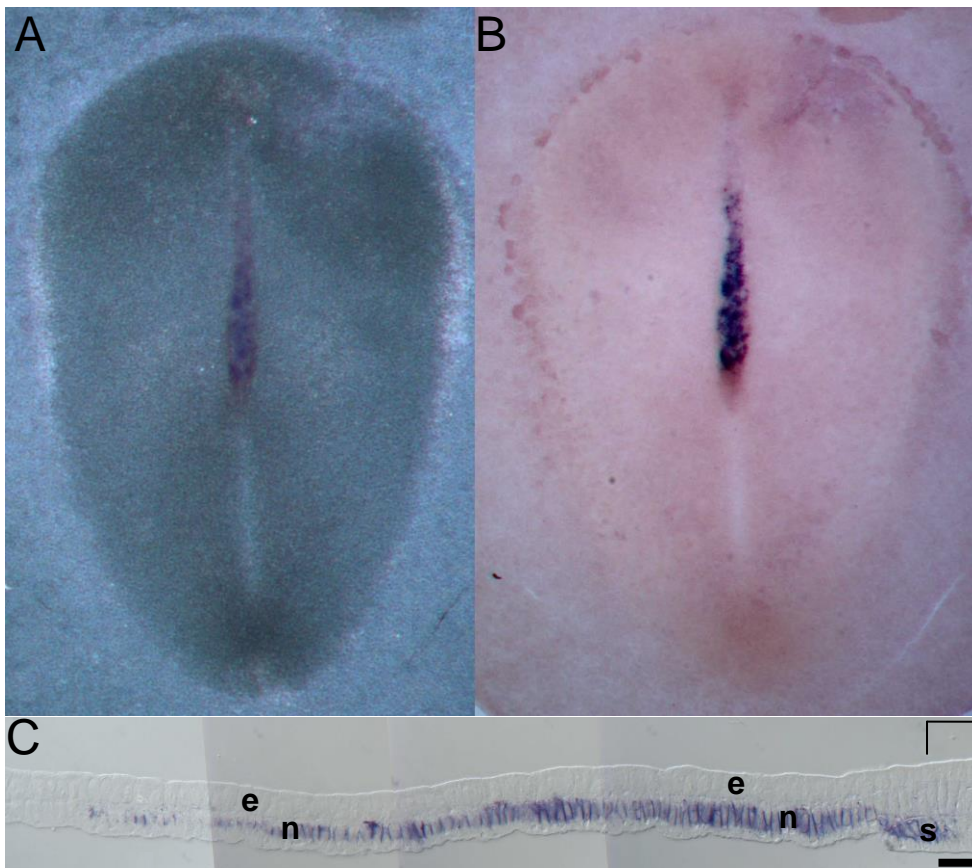


Abbildung 24: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 6-Embryos nach ISH für *dynein 11*, C Sagittalschnitt eines Embryos, e Neuroektoderm, n Chorda, s subchordales Mesoderm, [ Primitiv-knotenregion. Maßstab in A und B 0,108 mm, in C 20  $\mu$ m.



Auch *dynein 11* zeigt im Stadium 7 eine schwächere Färbung, sie beginnt ein Stück anterior des Knotens und befindet sich ausschließlich in Chordazellen (Abb. 25). Nach vorn und hinten läuft die Farbintensität aus, bis keine Farbreaktion mehr zu erkennen ist. Dies ist etwa auf der Hälfte der Chordalänge zu beobachten, also noch weit entfernt vom anterioren Chordaende und einige Zellreihen entfernt vom Knoten, der nicht mehr angefärbt erscheint. Die Expression erfolgt im Gegensatz zum *dynein 9* kontinuierlich und ist stärker ausgeprägt, lässt aber im fortgeschrittenen Stadium 7 ebenfalls schnell nach.

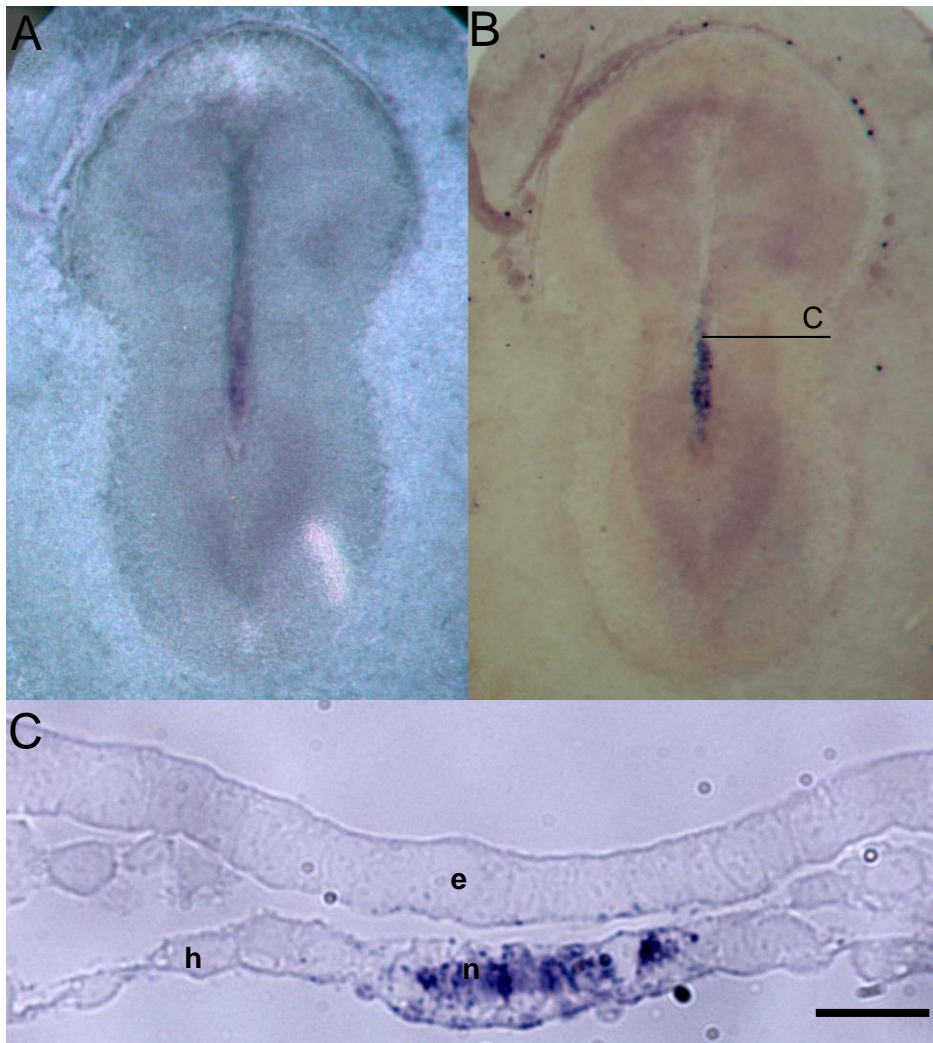


Abbildung 25: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 7-Embryos nach ISH für *dynein 11*, C Transversalschnitt des Embryos im caudalen Bereich der Chorda, e Ektoderm, n Chorda dorsalis, Maßstab in A und B 0,44 mm, in C 20 µm.

## Dynein 5

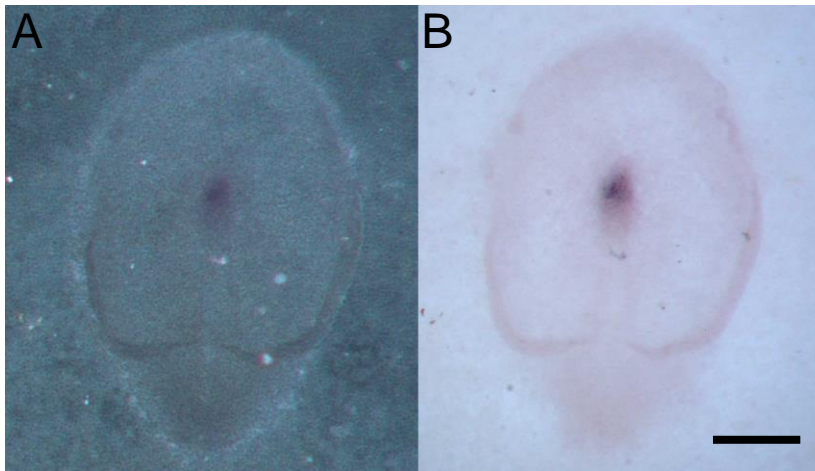


Abbildung 26: Dunkelfeld- und Hellfeldaufnahme eines Stadium 4-Embryos nach ISH für *dynein 5*, Maßstab 1 mm.

Beim *dynein 5* ist die Expression im Stadium 4, wie auch bei den anderen beiden Dyneinen im Knotenbereich an einer schwachen Reaktion zu erkennen (Abb. 26), die für die Analyse an Schnittpräparaten von 5  $\mu$ m

nicht stark genug ist (ohne Abbildung).

*Dynein 5* wird im Stadium 5 im mittleren Bereich der Chorda exprimiert, nicht mehr im Knoten und auch nicht in den vordersten Abschnitten der Chorda.

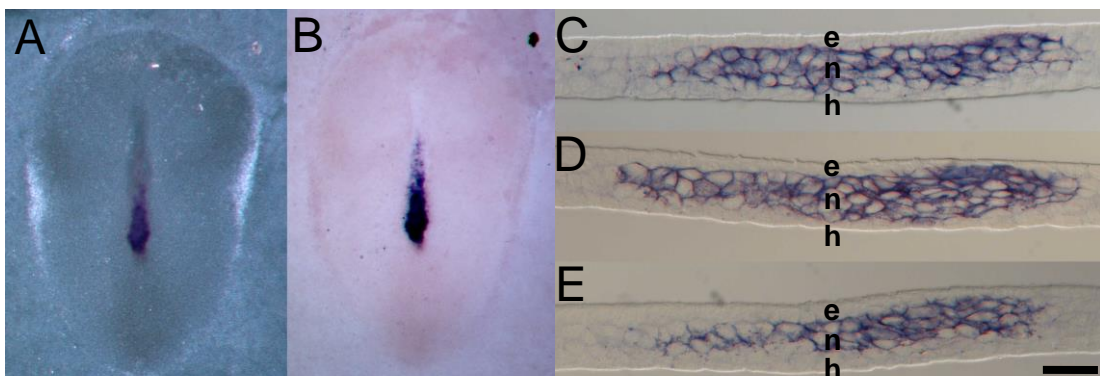


Abbildung 27: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 5-Embryos nach ISH für *dynein 5*, C-E Sagittalschnitte eines Stadium 5 Embryos, C lateral, D ungefähr median, E lateral, Ektoderm und Hypoblast sind ungefärbt, die Färbung lässt in posteriore Richtung zum Knoten hin stark nach, e Ektoderm, n Chorda dorsalis, h Hypoblast. Maßstab in A und B 0,285 mm, in C-E 20  $\mu$ m.

Die Färbung fällt in diesem Stadium ähnlich stark aus wie beim *dynein 11*, erreicht jedoch nur eine etwas geringere Längenausdehnung in anteriore Richtung. Ektoderm und Hypoblast sind ungefärbt, ebenso laterales Gewebe. Das subchordale Mesoderm erscheint nicht angefärbt (Abb. 27 D, man sieht am linken Bildrand einen hellen, d.h.

ungefärbten Keil unterhalb der angefärbten Chordazellen. Dieser helle Keil entspricht dem subchordalen Mesoderm.

Beim *dynein 5* zeigt sich im Stadium 6 im Vergleich zu den anderen Dyneinen ein ähn-

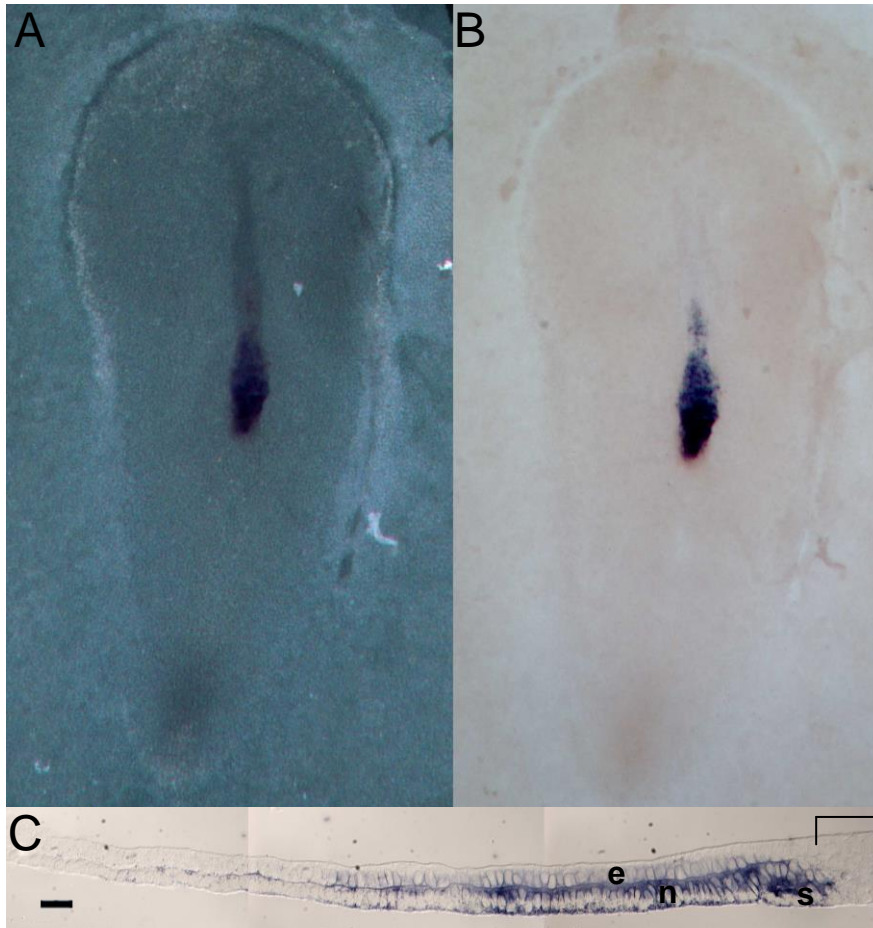


Abbildung 28: Dunkelfeld- (A) und Hellfeldaufnahme (B) eines Stadium 6-Embryos nach ISH für *dynein 5*, C Sagittalschnitt, e Ektoderm, n Chorda dorsalis, s subchordales Mesoderm, [ Primitivknoten. Maßstab in A und B 0,114 mm, in C 20 µm.

liches Bild, auch hier ist die Region vor dem Knoten besonders stark angefärbt, die letzten Zellreihen direkt vor dem Knoten und die Zellen im Knoten selbst zeigen dagegen keine Färbung (Abb. 28). In anteriore Richtung schwächt sich die Färbung zusehends ab und verliert sich bereits vor dem anterioren Ende der

Chorda. In den Sagittalschnitten fällt auf, dass über stark angefärbten Chordaarealen im hinteren Chordabereich auch eine schwächere Färbung der darüber liegenden Ektodermzellen zu erkennen ist, die sich weiter nach vorn verliert. Auch das subchordale Mesoderm ist in Teilen angefärbt (Abb. 28 C), es entspricht am hinteren Ende des gefärbten Areals dem gefärbten, rundlichen Zellstrang, der die Chordazellen unterlagert.

*Dynein 5* zeigte nur in einem Embryo des Stadiums 7 eine sehr schwache Farbreaktion im hinteren Teil der Chorda, in den übrigen Embryonen dieses Stadiums war keine Genexpression nachweisbar (ohne Abbildung)

Mit den o.g. Primern ließen sich RNA-Sonden für *dynein 5* und *11* herstellen, die jedoch in Embryonen der Stadien 4-8 keine Farbreaktion zeigten. *Dynein 9* ließ sich aus der gRNA der *Tuba uterina* nicht amplifizieren.

## 4 DISKUSSION

Während sich bei Maus und Kaninchen große Übereinstimmungen in Bezug auf die Zweischichtigkeit und das Vorkommen subchordalen Mesoderms, die ventrale Bedeckung und Zilien an der ventralen Oberfläche der Chorda dorsalis zeigten, wies das Schwein mit zunehmenden Entwicklungsstadien größere Abweichungen auf, bestehend u.a. in einer deutlich zellreicheren, und ventral bedeckten Chorda dorsalis. Zwar ist auch beim Schwein subchordales Mesoderm erkennbar, freie Zilien konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Die schweren Ketten 5, 9 und 11 des ziliären Motorproteins Dynein zeigten nicht nur relativ ähnliche Expressionsmuster, ihre Expression war auch auf eine bestimmte Gruppe notochordaler Zellen begrenzt.

### 4.1 Methodisches

Die Auswahl der Spezies für die morphologischen Betrachtungen ist nicht frei von praktischen Überlegungen, z.B. bezüglich der Verfügbarkeit entsprechender Embryonen und bereits etablierten Modellorganismen. Daher waren die Maus als das am weitesten verbreitete Tiermodell und das Kaninchen als Modellorganismus für die Expressionsanalyse von Beginn an festgelegt. Um noch ein anderes Säugetier, das auch adult dem Menschen anatomisch ähnlicher ist, in die Untersuchungen mit einzubeziehen, wurde das Schwein ausgewählt. Um die Reihe der Amnioten zu vervollständigen, wurden die Untersuchungen um Hühnerembryonen als Vertreter der Vögel ergänzt.

Ziel bleibt selbstverständlich immer ein speziesübergreifendes Modell, das Voraussagen für andere Spezies, insbesondere den Menschen, erlaubt. Daher wurden die Spezies auch möglichst unterschiedlich gewählt. Der Mensch ähnelt in seinen Entwicklungsphasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlichen anderen Spezies. In der Frühentwicklung finden sich durch die Keimscheibe v.a. Parallelen zum Kaninchen und zum Huhn, die Entwicklung der Chorda scheint aber Parallelen zum Schwein zu zeigen, während die Maus mit ihrem Eizylinder ganz andere morphologische Wege beschreitet. Kaninchen und Schwein wurden bereits früh als Modellorganismus verwendet (von Hensen 1876, Kölliker 1882, Gerhardt 1909; Streeter 1927, Heuser 1927; Heuser und Streeter 1929).

Das Kaninchen bietet in der frühen Embryonalphase sehr gute Untersuchungsbedingungen, da es sich um eine flache Keimscheibe (Gerhardt et al. 1909) handelt. So ist eine morphologische Beurteilung und auch eine Beurteilung des Expressionsmusters einfacher und sicherer möglich als beispielsweise im Eizylinder der Maus. Zudem ist die Entwicklung in einer Keimscheibe eine Parallele zur Entwicklung des menschlichen Embryos.

Ein weiterer Vorteil ist die genaue Stadieneinteilung (Viebahn 2004) anhand morphologischer Kriterien, was beispielsweise bei der Maus nicht so leicht möglich ist (Theiler 1989; Downs und Davies 1993). So ist bei Expressionsanalysen nun eine genaue Stadienzuordnung einer Expression, natürlich im Rahmen der Sensitivität der eingesetzten Hybridisierungs- und Nachweismethoden, möglich. Die Keimscheibe erlaubt eine Identifizierung der Expressionsdomänen, ohne dass wie bei der Maus Rekonstruktionen erforderlich werden.

Nachteile sind die weniger dichten genomischen Daten im Kaninchen, die vergleichsweise teure Haltung bei längerer Gestationsdauer, und die fehlende Verfügbarkeit transgener Modelle etc., wie sie z.B. das Mausmodell bietet.

Die cDNAs der drei hier untersuchten Dyneine konnten aus gRNA (gesamt -RNA) eines Kaninchenembryos 13 Tage *post conceptionem* isoliert werden. Dies bot den Vorteil einer ausreichenden gRNA-Menge um die drei hier untersuchten Gene aus einer gRNA zu amplifizieren, bei Verwendung jüngerer Embryonen, z.B. der hier untersuchten Stadien, wären mehrere Embryonen notwendig gewesen, um die benötigte gRNA-Menge zu erhalten.

Zur *In-situ*-Hybridisierung wurden digoxigeninmarkierte cRNA-Sonden verwendet, da diese stabiler und spezifischer an die komplementären mRNA-Produkte binden als es sequenzidentische cDNA-Sonden tun würden. Dennoch bringt die Verwendung von RNA-Sonden auch Nachteile mit sich, so ist das Verfahren der Herstellung mittels *In-vitro*-Transkription auf Grund der ubiquitär vorkommenden RNAsen fehleranfällig. Da aber insbesondere die frühen Embryonalstadien nur wenige die entsprechende RNA-produzierende Zellen und auch relativ geringe RNA-Mengen vermuten lassen, ist das Verfahren der *In-situ*-Hybridisierung mit RNA-Sonden trotz aller Nachteile Mittel der Wahl.

Um die Genexpression sichtbar zu machen, wurde eine farbstoffbasierte, nicht-radioaktive Variante der *In-situ*-Hybridisierung für Häutchenpräparate, so genannte „whole mounts“ eingesetzt („*whole mount in-situ-hybridisation*“, WMISH). Dieses Verfahren beruht auf einer Körbchen-Technik, die eine Verletzung der Präparate minimiert und gleichzeitig bei relativ hohen Hybridisierungstemperaturen und konstanter Salz- und Formamidkonzentration unspezifische Bindungen der Sonde vermindert. Durch dieses Vorgehen wird die Sensitivität erhöht, was sich insbesondere für den Nachweis einer schwachen Genexpression in einzelnen Zellgruppen als besonders vorteilhaft erwies.

Die verschiedenen im Protokoll vorgesehenen Detergenzien (Tween 20, CHAPS) und Proteinase K (vgl. Tab. 2.1) sicherten das Vordringen der Sonde in alle Gewebsschichten, da die Embryonen der untersuchten Stadien (4-7) bereits mehrschichtig sind. Da die Zellschichten jedoch auch zwischen diesen Stadien stark variieren, wurde die Einwirkzeit der Proteinase K angepasst (10 min bei Stadium 4 bis 15 min bei Embryonen im Stadium 7, vgl. 2.11.2).

Um eine Tendenz auch der Quantität zeigen zu können, wurden mindestens 3 Embryonen pro Stadium mit der jeweiligen Sonde untersucht, dennoch können lediglich qualitative Aussagen definitiv getroffen werden. Für eine quantitative Aussage wären nicht nur ungleich mehr Embryonen, sondern auch andere Untersuchungstechniken wie die *Real-Time*-PCR notwendig. Diese ermöglicht eine genaue Bestimmung der mRNA-Konzentration zum jeweiligen Entwicklungszeitpunkt, lässt aber eine topographische Zuordnung nur sehr eingeschränkt und unter erhöhtem Aufwand zu, z.B. durch vorhergehende Mikropräparation und *Real-Time*-PCR nur bestimmter Abschnitte des Embryos. Da für eine mögliche Funktion des Dyneins die Lokalisation entscheidender wäre als die Menge, blieb die *In-situ*-Hybridisierung das einzige Untersuchungsverfahren.

Die Genexpression konnte durch die Einbettung in Technovit®, das eine Anfertigung von 5µm dicken Schnitten erlaubte, auch schichtspezifisch beurteilt werden. Bei einer Auflösung bis zur 1000-fachen Vergrößerung war auch eine Betrachtung auf zellulärer und subzellulärer Ebene möglich, so konnte z.B. anhand der Farbverteilung kontrolliert werden, dass die Sonde an die mRNA im Zytoplasma bindet und nicht vorrangig im Zellkern.

## 4.2 Vergleichende Morphologie

Tabelle 3: Darstellung der Entwicklung der Chorda dorsalis in Abhängigkeit von den Stadien unter Berücksichtigung der allgemeinen Stadieneinteilung (vgl. Tab. 1)					
Stadium	Huhn	Mensch	Schwein	Kaninchen	Maus
<b>5</b> <b>(Hamburger und Hamilton) frühe Chorda</b>	Knoten frei von Zilien, kontinuierliche Hypoblastbedeckung ventral, wachsende Chorda	(Carnegie-Stadium 7) wachsende Chorda, nur mäßig organisiert, verbunden mit Hypoblast	Wachsende Chorda und Knoten ventral mit Hypoblast bedeckt, Chordazellen nur mäßig organisiert	Wachsende Chorda, z.T. noch mit Hypoblast bedeckt, z.T. noch mäßig organisierte Chordazellen, Knoten mit Hypoblast bedeckt	(Theiler-Stadium 10) Zilien auf der ventral freiliegenden Chorda und Knoten
<b>6</b> <b>(Hamburger und Hamilton) spätes Präsomitenstadium</b>		(Carnegie 8) Prismatische Chordazellen von Hypoblast bedeckt, ein Chordakanal ist beschrieben	Knoten und Chorda von Hypoblast bedeckt, Chorda meist als Platte organisiert	Vergleichbar mit 5, vorn freie ventrale Oberfläche der prismatischen Zellen mit freien einzelnen Zilien	(Theiler 11) Chorda nach vorne ausgehnter als in Theiler 10, seitlich mit Endoderm verbunden
<b>7</b> <b>(Hamburger und Hamilton) 1-3 Somitenpaare</b>		(Carnegie 9) Variable Form der Chorda entlang der kranio-kaudalen Achse	Vergleichbar mit Stadium 6	Knoten und Chorda mit früheren Stadien vergleichbar, z.T. ein Lumen innerhalb der Chorda oder eine Chordaplatte	(Theiler 12) motile Zilien auf der ventral freiliegenden Chorda, aber kein gerichteter Zilienschlag
<b>8</b> <b>(Hamburger und Hamilton) 4-6 Somitenpaare</b>		(Carnegie 10) Chordaplatte kontinuierlich mit Endoderm verbunden			(Theiler 13) Knoten und Chorda vergleichbar mit früheren Stadien, kontinuierliche Endodermbedeckung



Der morphologische Vergleich zwischen den Spezies fand nur im Hinblick auf die Chorda dorsalis und die direkt benachbarten Strukturen statt. In der folgenden Tabelle werden die wichtigsten Kriterien direkt nebeneinander gestellt und sollen im Folgenden auch im Hinblick auf ihre Deutung erläutert und v.a. mit Beobachtungen an menschlichen Embryonen aus anderen Arbeiten verglichen werden.

Während, wie im Ergebnisteil gezeigt, beim Kaninchen und der Maus die Chorda im Stadium 5 bereits teilweise ventral unbedeckt ist und Zilien trägt (vgl. auch Feistel und Blum 2006), findet sich beim Menschen, wie auch beim Schwein (Gros et al. 2009) und Huhn eine ventrale Zellschicht (Jurand 1974, Bancroft und Bellairs 1976, Manner 2001), die die Chorda durchgehend bedeckt. Die Chorda erscheint gemäß eigenen Beobachtungen in diesem Stadium bei allen Spezies noch nicht in ihrer endgültigen, epithelialen Anordnung. Beim Schwein zeigen die Zellen dabei eine fortgeschrittene apikal-basale Differenzierung. Im Elektronenmikroskop kann eine Basalmembran zwischen Chorda und Neuroektoderm nachgewiesen werden, im Bereich des Knotens fehlt diese allerdings (persönliche Mitteilung Dr. Schwartz). Dies entspricht der auch lichtmikroskopisch eindeutigen Trennung der beiden Zellschichten im Bereich der auswachsenden Chorda mit Aufhebung dieser Trennung im Knotenbereich. Die Zellen des Endoderms ventral der Chorda unterscheiden sich dabei morphologisch nicht von den umgebenden Endodermzellen, daher findet sich kein Hinweis für eine signalgebende Funktion. Zusätzlich beschreibt Manner (2001) bei Hühnerembryonen zu große Abstände zwischen den einzelnen Monozilien, um einen gerichteten Fluss zu erzeugen. Der entstehende Chordafortsatz des Hühnerembryos wird bei Bancroft und Bellairs (1976) bereits als bilaminare Struktur beschrieben. Diese Hypoblastbedeckung konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Beim Menschen ist das Stadium 7 nach Carnegie vergleichbar, auch hier entsteht die Chorda als charakteristisches Merkmal dieses Stadiums (O'Rahilly und Müller 1987b; 2002). Die Länge des Chordafortsatzes, der in der Literatur vom definitiven Notochord unterschieden wird (Harrison 1963, O'Rahilly und Müller 1987b, Muller und O'Rahilly 2004), kann innerhalb eines Stadiums erheblich an Länge variieren. Auch beim Menschen imponieren die Chordazellen nahe des Knotens noch rundlicher und weniger geordnet als die Zellen der definitiven Chorda, doch erscheinen nach unseren Beobachtungen sowie entsprechenden Abbildungen in der Literatur, die Chordazellen

menschlicher Embryonen bereits erheblich differenzierter und epithelähnlicher als die Chordazellen in vergleichbaren Stadien beim Kaninchen und Schwein. Beim Menschen gewinnt der Chordafortsatz recht schnell Anschluss an das Endoderm (O'Rahilly und Müller 1987b). In einigen Individuen ist bereits in diesem frühen Stadium ein Chordakanal (O'Rahilly und Müller 1987b; Muller und O'Rahilly 2004), als Fortsetzung der Primitivgrube (O'Rahilly und Müller 2011), die schließlich an der Entstehung des neurenterischen Kanals beteiligt ist, beschrieben. Dabei wurde eine Unterbrechung des Kanals im mittleren Drittel des Chordafortsatzes beobachtet, initial wird der Chordafortsatz ein solider Strang kuboider bis zylindrischer Zellen beschrieben, die teilweise radiär um den Chordakanal angeordnet sind, bis schließlich der ventrale Anteil verschwindet (Muller und O'Rahilly 2004). Ein solcher Kanal zeigt sich auch in dem vorliegenden Schnitt.

Der Mäuseembryo hat zu diesem Zeitpunkt bereits den Eizylinder gebildet. Die Stadieneinteilung bei der Maus ist ebenfalls eine andere, so entspricht das Theiler-Stadium 10 dem Stadium 5 nach Hamburger und Hamilton. Der Primitivknoten befindet sich am Pol des Eizylinders, Primitivstreifen und Chorda verlaufen von hier in divergierende Richtungen. Bereits unter der Lupe ist am Knoten eine kleine Einziehung, die Primitivgrube, zu sehen. Innerhalb des Eizylinders sind die Chordazellen von epithelalem Charakter und durchaus mit den Chordazellen im Kaninchen vergleichbar. Auch hier unterscheidet man einen Chordafortsatz von der definitiven Chorda (Kaufmann 1999), wobei Yamanaka et al. (2007) einen notochordalen Kopffortsatz, der nicht aus dem Primitivknoten stammt, und einen Chordastamm, entstehend aus dem Knoten, unterscheiden. Sulik et al. (1994) beschreiben zusätzlich motile Zilien auf der ventral frei liegenden Oberfläche des strangförmigen Chordafortsatzes, diese Zilien sind auf der posterioren Zelloberfläche lokalisiert (Song et al. 2010). Diese Anordnung zeigt sich auch in den von uns analysierten Schnitten.

Im Stadium 6 finden sich vermehrt Unterschiede auch in der Chordamorphologie. Während beim Menschen ein Chordakanal beschrieben ist (O'Rahilly und Müller 2002), findet sich beim Schwein nach eigenen Beobachtungen eher eine Platte aus Chordazellen, die aber immer noch ventral bedeckt ist (Vandenberg und Levin 2010) im elektronenmikroskopischen Bild des Schweineembryos ist jedoch zu erkennen, dass einige Zellen ventral durchaus freiliegen, doch bildet dies keine größere

zusammenhängend freie Fläche, und auch Zilien sind nicht mit Sicherheit detektierbar (persönliche Mitteilung Dr. Schwartz). Wie auch in den uns vorliegenden Schnitten ist beim Menschen eine notochordale Platte im dorsalen Teil der Chorda zu erkennen, ventral der notochordale Fortsatz (O'Rahilly und Müller 1987b), nach rostral schließt sich die histologisch unterscheidbare Prächordalplatte an (O'Rahilly und Müller 2002). Das Endoderm weist in den Carnegie-Stadien 7 und 8 ventral bereits Lücken auf (O'Rahilly und Müller 2006).

Bei Kaninchen und Maus konnten wir eine ventral meist freiliegende Chorda zeigen, die Zilien trägt, McGrath et al. (2003) und Feistel (2006) konnten die Motilität dieser Zilien zeigen. Der Mäuseembryo weicht durch seine Form weiterhin von den übrigen Spezies ab. Im Theiler-Stadium 11 ist der Beginn der Neurulation zu beobachten, die Chorda liegt ventral in der Mittellinie frei und verengt sich nach vorn. Die Chordaplatte imponiert breit und rundlich. Auf der freien Fläche tragen die Zellen einzelne Zilien, seitlich sind sie mit dem Endoderm verbunden. Die meisten Zilien sind Monozilien, doch lassen sich elektronenmikroskopisch verschiedene Zilienarten unterscheiden (McGrath et al. 2003, Feistel und Blum 2006), die wahrscheinlich verschiedene Funktionen im Rahmen der Rechts-Links-Differenzierung wahrnehmen.

Das Stadium 7 ist das frühe Somitenstadium, in dem die menschliche Chorda eine höhere Bandbreite von morphologischen Variationen zeigt, beim Schwein und Kaninchen jedoch morphologisch wenige Unterschiede zum Stadium 6 aufweist. Der Hauptunterschied ist die Länge, beim Kaninchen kann sich auch ein Lumen in der Chorda oder ein eher plattenartiger Chordaabschnitt zeigen. Ein Lumen innerhalb der Chorda ist auch beim Rind beschrieben (Walter et al. 2010). Beim Menschen entspricht das erste Somitenstadium dem Carnegie-Stadium 9, die Chorda erscheint vergleichbar zu Schwein und Kaninchen, der Chordafortsatz hat sich vollständig in eine Chordaplatte umgewandelt und reicht rostral bis zur oropharyngealen Membran (Muller und O'Rahilly 2004). Knotennah erscheint die Chorda als rundlicher Strang, weiter nach vorn zeigen sich ähnliche Veränderungen wie bei den beiden anderen Spezies, erst zeigt sich eine Art Einziehung ventral und ganz anterior, schließlich formt sich die Chorda zu einer Platte (O'Rahilly und Müller 2006). Die Chorda ist zum Großteil in das Endoderm eingebettet. Auch in diesem Stadium ist ein Chordakanal beschrieben (O'Rahilly und

Müller 2002), dieser Kanal trennt den rostralen vom kaudalen Teil der Chorda (Rüsse und Sinowatz 1991).

Bei der Maus entstehen im Stadium 12 nach Theiler die ersten Somiten, gleichzeitig beginnt der Embryo sich zu drehen. Die Neuralfalten erscheinen in diesem Stadium als prominenteste Struktur, der Knoten liegt mittlerweile recht weit kaudal im Embryo. Auf der ventral freiliegenden Chorda liegen motile Zilien, die aber nach Sulik et al. (1994) keinen gerichteten Schlag zeigen. Es findet sich keine einem Chordakanal vergleichbare Struktur (O'Rahilly und Müller 2002). Während beim Huhn keine ventral freiliegenden Zilien beschrieben sind, erwähnt Balinsky (1970) einen Kanal in der Chorda bei anderen Vögeln wie z.B. Enten.

Im Stadium 8 als einem späteren Somitenstadium ist die definitive Chorda beim Menschen (Muller und O'Rahilly 2004) und auch bei der Maus ventral von Endoderm bedeckt (Yamanaka et al. 2007), doch ist bereits im Stadium 7 (bei Rind: (Schroder et al. 2016); Schwein: (Gros et al. 2009)), oder im Stadium 8 (Kaninchen: (Blum et al. 2007)), die Rechts-Links-Differenzierung durch eine asymmetrische *nodal*-Expression festgelegt.

#### 4.3 Dyneinexpression

Die Genexpression lässt sich durch die flache Morphologie der Keimscheibe bereits in der Aufsicht bestimmten Regionen zuordnen und in der histologischen Aufarbeitung auch bestimmten Zellschichten innerhalb des Embryos. Insgesamt zeigen die Expressionsmuster aller drei untersuchten Dynein-Schwerketten große Ähnlichkeit, wenn auch keine völlige Übereinstimmung. Die hier ausgewählten Dynein-Schwerketten scheinen in Mensch und Maus, aber auch in Zebrafisch und Krallenfrosch, eine Rolle in der Achsenentwicklung zu spielen (Supp et al. 1997, Omran et al. 2000, Bartoloni et al. 2002, Ibanez-Tallon et al. 2002, Olbrich et al. 2002, Essner et al. 2005, Schwabe et al. 2008, Loges et al. 2008, Leigh et al. 2009a, Vick et al. 2009, Skeik und Jabr 2011).

Andere Untersuchungen weisen auf die entscheidende Funktion von Monozilien (*primary cilia*) bei der Regulation der planaren Zellpolarität hin (Kernan 2007; Fischer und Pontoglio 2009), ein Charakteristikum, das wohl zumindest Säugetieren gemein ist. Diskutiert wird neben der Funktion des Zilienschlags zum Transport noch unbekannter

Signalmoleküle, auch eine sensorische Zilienfunktion, die die Zellbewegung und Orientierung wahrnehmen und somit eine Steuerung ermöglichen könnte (Fischer und Pontoglio 2009, Leigh et al. 2009a, Sas et al. 2011).

Alle drei Dynein-Schwerketten fanden sich erwartungsgemäß in der Chorda dorsalis des Kaninchens exprimiert, passend zum elektronenmikroskopischen Bild der Zilienlokalisierung mit je einem Monozilium auf einer Chordazelle (Blum et al. 2007). Die Expression war jedoch nicht auf der gesamten Chordalänge nachweisbar, sondern in den frühen Stadien v.a. im posterioren und damit knotennahen Bereich. Im Stadium 7 als dem letztem hier untersuchten und noch nicht asymmetrisch festgelegtem Stadium ließ die Expression stark nach und zeigte sich nur noch in den mittleren Chordaanteilen oder bereits gar nicht mehr. Auffällig war die Expression ausschließlich in den Chordazellen, und auch hier nur im hinteren, knotennahen Anteil, der noch zentral im Embryo gelegen ist. Das Expressionsmuster ist durchaus vergleichbar mit den Mustern ziliärer Markergene, die Feistel und Blum (2006) nachwiesen. Bereits im Stadium 8 ist die Rechts-Links-Orientierung der Kaninchenkeimscheibe durch eine asymmetrische Nodal-Domäne, regulär im linken Seitenplattenmesoderm, festgelegt.

Durch den Nachweis einer zufälligen Achsentwicklung bei Umkehrung des Flusses in *iv*-Mäusen (Nonaka et al. 2002) ist eine Beteiligung der Zilien sehr wahrscheinlich, der genaue Mechanismus bleibt jedoch weiterhin unklar, (Blum et al. 2014a, 2014b) weisen ebenfalls auf diese ungelöste Problematik hin. Dynein ist ein entscheidendes Protein für die Zilienbewegung. Bei Patienten mit *Situs inversus* bzw. mit Karthagener-Syndrom finden sich häufig Mutationen in Dynein-Genen, so dass eine Beteiligung an der Ausbildung der Körperachsen vermutet werden kann. Die verschiedenen Dyneine zeigen eine extrem konservierte Sequenz, über die Speziesgrenzen hinaus. Ihre Funktion ist vielfältig, einige dienen als ziliäre Motorproteine, andere sind entscheidend für den intrazellulären Transport. Die zu klärende Frage war nun, ob Dyneine, die als ziliäre Motorproteine fungieren, auch im Embryo zur entscheidenden Zeit und an der richtigen Lokalisation zu finden sind.

Im Kaninchen konnten wir eine solche Dyneinexpression für die Dyneine 5, 9 und 11 nachweisen. Sie sind allein in der Chordaregion exprimiert. So sind sie in der richtigen Position, um einen Signalgradienten, wie er oben beschrieben ist, zu erzeugen, oder aufrecht zu erhalten. Vergleichbare Ergebnisse finden sich in *Xenopus* und Maus (Vick

et al. 2009). Demnach findet sich eine *dnah5*-Expression in der Neurula, *dnah9* mit Beginn der Neurulation, und *dnah11* im *early tailbud*-Stadium. Beim Schwein ließen sich die Dyneine nicht in den entsprechenden Stadien nachweisen. Die *Dyneine 5* und *11* ließen sich amplifizieren, ihre Expression aber nicht in der *In-situ*-Hybridisierung nachweisen. *Dynein 9* hingegen ließ sich mit den oben genannten Primern nicht amplifizieren.

Das Ergebnis lässt nun offen, ob die so hergestellten Sonden nicht binden, oder ob die entsprechenden Dyneine nicht im frühen Schweineembryo exprimiert werden. Dazu wären weitere Kontrollfärbungen notwendig. So bleibt zu diskutieren, ob das Dynein seine Funktion nur in den Organismen entfaltet, die Zilien auf der ventral unbedeckten Chorda dorsalis tragen, oder ob es einen anderen, möglicherweise intrazellulären Mechanismus gibt, der über Dyneine zur Rechts-Links-Differenzierung führt.

#### 4.4 Die Chorda dorsalis als Achsenstruktur und Signalzentrum

Die Chorda dorsalis als median gelegenes, strukturgebendes Achsenorgan erscheint uns rein durch ihre Lage als prädestinierte Struktur zur Determinierung der Rechts-Links-Differenzierung. Die zur Zeit weit verbreitete Theorie vom Zilienschlag, der einen seitendifferenten Signalgradienten erzeugen soll, ist aufgrund der morphologischen Gegebenheiten nicht für alle Spezies anwendbar. So finden sich z.B. beim Schwein vor der molekularen Festlegung der Körperhälften (*nodal* im Seitenplattenmesoderm) keine freien Zilien auf der Chorda, so ist *nodal* früh asymmetrisch in parachordalen Zellen, in Maus und Kaninchen jedoch nicht (Schroder et al. 2016).

Kaninchen und Maus dagegen verfügen theoretisch über die Möglichkeit einen solchen Signalmolekülgradienten mittels Zilienschlag auszubilden, doch konnte in der Maus gezeigt werden (Sulik et al. 1994), dass die in Frage kommenden Zilien keinen gerichteten Zilienschlag produzieren. Dennoch sind beim Menschen und auch in Tiermodellen (Kawakami et al. 2008, Loges et al. 2008; Leigh et al. 2009a; Vick et al. 2009, Okumura et al. 2009; Hildebrandt et al. 2009; Merveille et al. 2011). Ziliendefekte, so auch Defekte des Motorproteins Dynein, immer wieder mit Fehlern der Rechts-Links-Differenzierung assoziiert. Dies könnte auf eine bislang unentdeckte Funktion der ziliären Motorproteine hindeuten, oder aber es muss von evolutionär unterschiedlichen Achsendeterminierungsmechanismen ausgegangen werden, eine

Annahme die durch die Verwandtschaftsbeziehungen der hier untersuchten Spezies eher unwahrscheinlich ist, da die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Maus, Kaninchen und Mensch enger sind als zum Schwein oder gar zum Huhn.

Die Morphologie der Chorda dorsalis ist bei den untersuchten Spezies auf den ersten Blick sehr ähnlich, da die Entwicklung der Chorda in verschiedenen Stadien vergleichbar verläuft. Die Chorda entwickelt sich zunächst als Strang ungeordneter Zellen. Bei allen findet sich zudem die Gemeinsamkeit des subchordalen Mesoderms. Im Laufe der Entwicklung des Embryos nimmt die Chorda eine organisiertere Form an, die Zellen bekommen einen epithelialen Charakter, ihre Anordnung erscheint geordneter, so sind sie besser vom umgebenden Mesoderm abzugrenzen.

Bei einigen Spezies wie dem Kaninchen und der Maus lockert sich die Hypoblastbedeckung bereits unter der noch wachsenden Chorda, bis sie schließlich eine freie ventrale Oberfläche bekommt. Bei anderen Spezies wie dem Schwein, dem Huhn und dem Menschen ist eine solche freie Oberfläche nicht in den untersuchten Stadien zu finden. Für die Spezies mit einer freien ventralen Oberfläche wird über freiliegende Zilien auf eben dieser Oberfläche berichtet, eine Funktion bei der Rechts-Links-Differenzierung wird postuliert (Feistel 2006). Möglichkeiten zur Induktion der Rechts-Links-Differenzierung wären ein gerichteter Zilienschlag, um beispielsweise einen Gradienten für Signalmoleküle zu erzeugen. Eine andere Möglichkeit wäre eine Art Barriere für eben solche Signalmoleküle, die so die Mittellinie, dargestellt durch die Chorda, nicht passieren können.

Diese beiden Funktionsweisen können jedoch nicht für die Spezies angenommen werden, deren Chorda in den für die Rechts-Links-Differenzierung entscheidenden Stadien ventral bedeckt ist, und die auf ihrer Chorda keine Zilien aufweisen.

#### 4.5 Mögliche gemeinsame Mechanismen der Rechts-Links-Differenzierung

Es besteht nun die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen Spezies auch unterschiedliche Mechanismen zur Rechts-Links-Differenzierung entwickelt haben. Ähnliches ist zum Beispiel aus der Plazentaentwicklung bekannt. Auch dort zeigen unterschiedliche Spezies sehr unterschiedlich ausgereifte Strukturen. Eine dünne Plazentarschranke mit kurzer Diffusionsstrecke korreliert hier nicht unbedingt mit der Entwicklungsstufe des Tieres. Das Schwein beispielsweise als Spezies, die dem

Menschen adult in vielen Strukturen gar nicht so unähnlich ist, zeigt eine eher primitive Plazenta (Persönliche Mitteilung Dr. Schwartz).

Eine andere Möglichkeit wäre ein Mechanismus, der evolutionär konserviert ist, aber unabhängig von notochordalen Zilien funktioniert.

Die vergleichende Morphologie kann hier allenfalls Hinweise auf den Mechanismus der Achsentwicklung geben, Hinweise auf Spezies, die aufgrund ihrer sehr ähnlichen Morphologie wahrscheinlich über ähnliche Mechanismen verfügen, und Hinweise auf Unterschiede zu anderen Spezies.

Der genaue Mechanismus lässt sich so jedoch nicht bestimmen, ggf. lassen sich aber einige Möglichkeiten, z.B. der Zilienschlag zur Rechts-Links-Differenzierung beim Schwein, ausschließen. Viele der untersuchten Modelle mit Ziliendefekten zeigen Mutationen *upstream* im wnt- und tgfb-Signalweg oder in der grundlegenden Zellstruktur (Okumura et al. 2009; Gray et al. 2009; Zhang und Levin 2009; Hildebrandt et al. 2009; Bettencourt-Dias et al. 2011). Diese Mutationen zeigen jedoch keineswegs nur Defekte der Achsenentwicklung, sondern oft schwere bis letale andere Defekte, so dass sie keine direkten Hinweise auf die Steuerung der Rechts-Links-Differenzierung geben.



## 5 Zusammenfassung

Die Rechts-Links-Differenzierung ist ein Phänomen, das bei allen höheren Tieren stark konserviert scheint, auch die Orientierung der inneren Organe ist speziessübergreifend auf eine bestimmte Körperseite festgelegt. Dies legt einen konservierten Regulationsmechanismus nahe. Dynein erfüllt als ziliäres Motorprotein die Anforderungen für eine solche Funktion, da eine Ziliendysfunktion beim Menschen gehäuft mit einem *Situs inversus* verbunden ist und Zilien bei der Rechts-Links-Differenzierung verschiedener Spezies eine Rolle zu spielen scheinen. Das Kaninchen beispielsweise, ein Modellorganismus, der in den frühen Embryonalstadien durch seine Keimscheibe den frühen Stadien des Menschen ähnlich ist, bietet auf der ventralen Seite seiner Chorda dorsalis als Achsenstruktur motile Zilien, die durch gerichteten Zilienschlag einen molekularen Gradienten erzeugen könnten. Dies ist nicht bei allen Modellorganismen der Fall, so dass z.B. beim Schwein auch eine andere Funktion diskutiert werden muss, sofern man von einem konservierten Mechanismus der Achsenfestlegung ausgeht. Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Suche nach Mechanismen, welche die Rechts-Links-Differenzierung molekular festlegen, noch bevor ein morphologisches Korrelat zu erkennen ist. Morphologisch fanden sich in den untersuchten Spezies Huhn, Maus, Kaninchen, Schwein und Mensch große Ähnlichkeiten im Aufbau der Chorda und des Primitivknotens, jedoch deutliche Unterschiede in der ventralen Bedeckung der Chorda im zeitlichen Verlauf. Beim Kaninchen fand sich die erwartete Dyneinexpression symmetrisch in der Chorda, was eine Funktion als Signalzentrum wahrscheinlich werden lässt, gleichartige Ergebnisse fanden sich in der Literatur bei Maus und Krallenfrosch. Beim Schwein mit einer ventral bedeckten Chorda ließen sich eine Expression der untersuchten Dynein-Schwerketten mittels *In-situ*-Hybridisierung bislang nicht nachweisen. Ein allgemeingültiger Mechanismus zur Regulation der Rechts-Links-Differenzierung ließ sich bislang nicht sicher festlegen, die Grundlagen für weitere Untersuchungen sind so aber gelegt.

## 6 Anhang

### Dynein 9, Kaninchen

#### Erster Klon

GGATCACGTCTCAGAAGTGGCTGG  
CAAAGATTGTAAGACTTCTCTGACACTGTCTGACACCAATCCTCATAAAGTCTTGTC  
TCATATTTGTCCAGTAACAAGAGTGTGTCTTCATATTTTTGTATCATTGCTTTCTTCA  
GCAGATTCCATGCAAGGATGTAGGATGCGGTCAAAGTTGCCGAAGGGACCTGAATGCGC  
TGCCTCAGCTCCTGTGCCAGCGGAGGCCCCAGCCACAGCAGGCATGTTCTTGTCACG  
GTGGAGAACCCAAGTCTGCCTCCTCTGGGTGTGCTGACTGTAGATGGTCTGACTGCA  
TCCAGGTCTTTGCTGAACATTCGAGTGAGGACCAGGTATTTCTCAGATGTATCCTGTGCT  
ACTAGTGGTCTCTCAAGGAGGTTTCCCGCAATGTCCAGCAGCTTAAAGGCATGCTCTAAT  
CCAGGTGAGTCATCAAAGCTTGAATAAAGATAGTCCCAGCCTTCGGTCAAGTCTTCT  
ACTCTTTGGTTAAATTCAGAGACGTCGGTTTTCAAATTCATGCTTTGGGGTCCAAGAAG  
TCATAGGACGACTCTGAGAAGACCCTGTACATCTCTTCAAATTCCTCGTACATTTGCTGC  
ACCTGCTGACTCAGGGCATTCCCTCGGATGCCACTAACTCAAGCTTTTCCAGTTTGTGG  
AAATCCAACGCTGTCTTCAGAAGATCCGTTACTACGTGCAGTCGTCCCAAGAAGCTGTCC  
AAGCGCACAAAGACCAGAGAAGACTGGAAATCCCACTCCTTGACTCCTGGTTCTCTTTG  
AAGTAAGTATGGAGATTCTCCCTTCTGTCCTGAAACACCTGCTTGAAGATGGT

#### Zweiter Klon

GGATCACGCTCAGAAGTGGCTGG  
CAAAGATTGTAAGACTTCTCTGACACTGTCTGACACCAATCCTCATAAAGTCTTGTC  
TCATATTTGTCCAGTAACAAGAGTGTGTCTTCATATTTTTGTATCATTGCTTTCTTCA  
GCAGATTCCATGCAAGGATGTAGGATGCGGTCAAAGTTGCCGAAGGGACCTGAATGCGC  
TGCCTCAGCTCCTGTGCCAGCGGAGGCCCCAGCCGACAGCAGGCATGTTCTTGTCACG  
GTGGAGAACCCAAGTCTGCCTCCTCTGGGTGTGCTGACTGTAGATGGTCTGACCGCA  
TCCAGGTCTTTGCTGAACATTCGAATGAGGACCAGGTATTTCTCAGATGTATCCTGTGCT  
ACTAGTGGTCTCTCAAGGAGGTTTCCCGCAATGTCCAGCAGCTTAAAGGCATGCTCTAAT  
CCAGGTGAGTCATCAAAGCTTGAATAAAGATAGTCCCAGCCTTCGGTCAAGTCTTCT  
ACTCTTTGGTTAAATTCAGAGACGTCGGTTTTCAAATTCATGCTTTGGGGTCCAAGAAG  
TCATAGGACGACTCCGAGAAGACCCTGTACATCTCTTCAAATTCCTCGTACATTTGCTGC  
ACCTGCTGACTCAGGGCATTCCCTCGGATGCCACTAACTCAAGCTTTTCCAGTTTGTGG

AAATCCAACGCTGTCTTCAGAAGATCCGTTACTACGTGCAGTCGTCCCAAGAAGCTGTCC  
AAGCGCACAAAGACCAGAGAAGACTGGAAATCCCCTCCTTGACTTCCTGGTTCTCTTTG  
AAGTAAGTATGGAGATTCTCCCTTCTGTCCTGAATCACCTGCTTGAAGAAGGTCAAGGTG  
TCCGAGACGACTTGAAGTTTTCTGACTTTCTTCTACCTCACTTCTCAGG

## Dynein 11, Kaninchen

### Erster Klon

GGTCCAACCTTTGCTTCTCTCC  
ATTATCTATTCTGGACAAATATGATGATACGTTAGTTTATCAGAAGTATGTTGAAATGA  
CTACTTTGCTAGAACAAATTTGAAAATGATATATATAAGGAATGGAAAAGTAATGTGGATG  
AAATCTGTGAATTCAATTTGAATCAACCCTTGCTCAAATTCAGTGCCATAAATGGTCTTC  
TCAGTGTCAACTTTGACCCAAAGCTAGTGCCGTAAGTACTGAGAGACGTGAAATACCTTTTGA  
TGTTGCAGAAGGTAGACATCCCAGATGCAGCCTTGCCATCCTCAAAGCAGAAACACAA  
TTTTAAAGTACATCGGGAATCTCGAGCTGCTGGTGCAAGGCTATAATAGGCTGAAGCAGA  
CTCTTCTGGAAGTTGAATACCCGCTGATTGAAGAAGAAGTACTGAGGACCTGGAGGAGCAGC  
TGAAGGCGGTGGCGACGTCCGTGACGTGGCGGGACGACTGCTGGGGCTACATTGAGAGCG  
TGAAGACGGCCACCTCGGAGCTGGAGCACAGAGTCCAGCGCACGCAGGACAACCTCGGGG  
CCATCCGGCAGGTGATGCGGGCCTGGGCCAGGGCCCGCTGCTCCCCAGGAGAGAGACACA  
GGAGGGAGGCCCGCTTCGCTGGGAGGACAGGGGCAACGTGTTACCAGGAAGTAATCAC  
TAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATG  
CATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG  
TTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA  
AAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG

### Zweiter Klon

GGTCCAACCTTTGCTTCTCTCC AT  
TATCTATTCTGGACAAATATGATGATACGTTAGTTTATCAGAAGTATGTTGAAATGACT  
ACTTTGCTAGAACAAATTTGAAAATGATATATATAAGGAATGGAAAAGTAATGTGGATGAA  
ATCTGTGAATTCAATTTGAATCAACCCTTGCTCAAATTCAGTGCCATAAATGGTCTTCTC  
AGTGTCAACTTTGACCCAAAGCTAGTGCCGTAAGTACTGAGAGACGTGAAATACCTTTTGTG  
TTGCAGAAGGTAGACATCCCAGATGCAGCCTTGCCATCTTCAAAGCAGAAACACAATT  
TTAAAGTACATTGGGAATCTCGAGCTGCTGGTGCAAGGCTATAATAAGCTGAAGCAGACT

CTTCTGGAAGTTGAATACCCGCTGATTGAAGAAGAACTGAGGACCCTGGAGGAGCAGCTG  
AAGGCGGTGGCGACGTCCGTGACGTGGCGGGACGACTGCTGGGGCTACATTGAGAGCGTG  
AAGACGGCCACCTCGGAGCTGGAGCACAGAGTCCAGCGCACGCAGGACAACCTCGGGGCC  
ATCCAGCAGGTGATGCGGGCCTGGGCCAGGGCCCGCTGCTCCCCAGGAGAGACAGG  
AGGGAGGCCGCCTTCGCCTGGGAGGACAGGGGCAACGTGTTACCAGGAAGTAATCACTA  
GTGAATTCGCGGCCCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCA  
TAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTT  
TCCTGTGTGAAATTGTTATCCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGGAAGCATA  
AAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATTGAGTGAGCTAAACTCACATTAATTGCG

### Dynein 5, Kaninchen

#### Erster Klon

TCCATCTGGAACCAGCCGCAGGATA  
TTGTGATGGAAAAATATTATCTGCAATTACACTTAAGCAGGAATACCAGCACTGCTTTC  
ATAAGACAAAGCAGAAGCTTAAAGAAAACCCACATGAGAAGCAATTTGAATTTAGTGAGA  
TGTATATTTTTGGAAAATTTGAACTTTCCACCGACGTCTTGCCAAGATAATAGACATCC  
TCACAACTTTCAAGACCTATTCAGTCCTGCAAGATTCTAAGATTGAAGGGCTAGAAGATA  
TGGTACTAAATATCAGGGCATTGTTGCAACTATAAAGAAAAGGAATATAATTTCTTAG  
ATCAGCGGAAAATGGATTTTGACCAGGATTATGAAGAATTTTGCAAGCAAATTGATGACC  
TTCATAATGAGTTACAGAAGTTCATGGATGTTACATTTGAAAAAATCAAACACAAATC  
AAGCTCTAAGTATGTTAAAGAAAATTTGAAAGATTGAACATACCTAATCTTGGTATTGATG  
ACAAATACAGGCTAATCCTTGAGAACTATGGGACTGACATTGATATGATTTCAAATTGT  
ACACAAAGCAGAAATATGATCCTCCTCTGGCTCGAGACCAGCCTCCCATTGCTGGGAAGG  
TTTTATGGGCCCGTCAGCTCTCCACAGGATCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGC  
AGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGT  
GTCACCTAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC  
CGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCT  
AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAA  
ACCTGTCGTG

#### Zweiter Klon

TCCATCTGGAACCAGCCGCAGGATATT  
GTGATGGAAAAATATTATCTGCAATTACACTTAAGCAGGAATACCAGCACTGCTTTCAT

AAGACAAAGCAGAAGCTTAAAGAAAACCCACATGAGAAGCAATTTGAATTTAGTGAGATG  
TATATTTTTGGAAAATTTGAAACTTTCCACCGACGTCTTGCCAAGATAATAGACATCCTC  
ACAACTTTCAAGACCTATTCAGTCCTGCAAGATTCTAAGATTGAAGGGCTAGAAGATATG  
GTCACTAAATATCAGGGCATTGTTGCAACTATAAAGAAAAAGGAATATAATTTCTTAGAT  
CAGCGGAAAATGGATTTTGACCAGGATTATGAAGAATTTTGCAAGCAAATTGATGACCTT  
CATAATGAGTTACAGAAGTTCATGGATGTTACATTTGAAAAAATTCAAACACAAATCAA  
GCTCTAAGTATGTTAAAGAAATTTGAAAGATTGAACATACCTAATCTTGGTATTGATGAC  
AAATACAGGCTAATCCTTGAGAACTATGGGACTGACATTGATATGATTTCAAATTGTAC  
ACAAAGCAGAAATATGATCCTCCTCTGGCTCGAGACCAGCCTCCCATTGCTGGGAAGATT  
TTATGGGCCCGACAGCTCTTCCACAGGATCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAG  
GTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT  
CACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG  
CTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGGGTGCCT  
AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGG

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Majeed S, Moloney BC, Nauli SM (2012): Mechanisms regulating cilia growth and cilia function in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 69, 165–173
- Ahne W: *Zoologie: Lehrbuch für Studierende der Veterinärmedizin und Agrarwissenschaften*. Schattauer, Stuttgart 2000
- Ajima R, Hamada H (2011): Wnt signalling escapes to cilia. *Nat Cell Biol* 13, 636–637
- Antic D, Stubbs JL, Suyama K, Kintner C, Scott MP, Axelrod JD (2010): Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One* 5, e8999
- Asai DJ, Brokaw CJ (1993): Dynein heavy chain isoforms and axonemal motility. *Trends Cell Biol* 3, 398–402
- Aw S, Levin M (2009): Is left-right asymmetry a form of planar cell polarity? *Development* 136, 355–366
- Aw S, Koster JC, Pearson W, Nichols CG, Shi NQ, Carneiro K, Levin M (2010): The ATP-sensitive K(+)-channel (K(ATP)) controls early left-right patterning in *Xenopus* and chick embryos. *Dev Biol* 346, 39–53
- Babinger K WR (2010): Primary cilia and polycystic kidney disease. *Zellbiologie aktuell* 36, 8–12
- Balinsky BI: *An Introduction to embryology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1970
- Bancroft M, Bellairs R (1976): The development of the notochord in the chick embryo, studied by scanning and transmission electron microscopy. *J Embryol Exp Morphol* 35, 383–401
- Bartoloni L, Blouin JL, Maiti AK, Sainsbury A, Rossier C, Gehrig C, She JX, Marron MP, Lander ES, Meeks M et al. (2001): Axonemal beta heavy chain dynein DNAH9: cDNA sequence, genomic structure, and investigation of its role in primary ciliary dyskinesia. *Genomics* 72, 21–33
- Bartoloni L, Blouin JL, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, Rossier C, Jorissen M, Armengot M, Meeks M et al. (2002): Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10282–10286
- Becker-Heck A, Zohn IE, Okabe N, Pollock A, Lenhart KB, Sullivan-Brown J, McSheene J, Loges NT, Olbrich H, Haeffner K et al. (2011): The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nat Genet* 43, 79–84

- Beckers A, Alten L, Viebahn C, Andre P, Gossler A (2007): The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15765–15770
- Bellomo D, Lander A, Harragan I, Brown NA (1996): Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent. *Dev Dyn* 205, 471–485
- Benninghoff A, Drenckhahn D: *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Bd. 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 16., völlig neu bearb. Aufl; Urban & Fischer, München 2003*
- Bettencourt-Dias M, Hildebrandt F, Pellman D, Woods G, Godinho SA (2011): Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet* 27, 307–315
- Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C (2008): Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction* 135, 181–195
- Blum M, Andre P, Muders K, Schweickert A, Fischer A, Bitzer E, Bogusch S, Beyer T, van Straaten HW, Viebahn C (2007): Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* 75, 133–146
- Blum M, Feistel K, Thumberger T, Schweickert A (2014a): The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* 141, 1603–1613
- Blum M, Schweickert A, Vick P, Wright CV, Danilchik MV (2014b): Symmetry breakage in the vertebrate embryo: when does it happen and how does it work? *Dev Biol* 393, 109–123
- Bonnafe E, Touka M, AitLounis A, Baas D, Barras E, Ucla C, Moreau A, Flamant F, Dubruille R, Couble P et al. (2004): The Transcription Factor RFX3 Directs Nodal Cilium Development and Left-Right Asymmetry Specification. *Molecular and Cellular Biology* 24, 4417–4427
- Borovina A, Superina S, Voskas D, Ciruna B (2010): *Vangl2* directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nat Cell Biol* 12, 407–412
- Brueckner M (2001): Cilia propel the embryo in the right direction. *Am J Med Genet* 101, 339–344
- Buceta J, Ibanes M, Rasskin-Gutman D, Okada Y, Hirokawa N, Izpisua-Belmonte JC (2005): Nodal cilia dynamics and the specification of the left/right axis in early vertebrate embryo development. *Biophys J* 89, 2199–2209
- Cambray N, Wilson V (2002): Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Development* 129, 4855–4866
- Cambray N, Wilson V (2007): Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors. *Development* 134, 2829–2840

- Campbell NA, Reece JB: *Biologie* (Spektrum Lehrbuch). Hrsg. v. Markl J. 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2003
- Charrier JB, Teillet MA, Lapointe F, Le Douarin NM (1999): Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development* 126, 4771–4783
- Cleaver O, Seufert DW, Krieg PA (2000): Endoderm patterning by the notochord: development of the hypochord in *Xenopus*. *Development* 127, 869–879
- Collins MM, Baumholtz AI, Simard A, Gregory M, Cyr DG, Ryan AK (2015): Claudin-10 is required for relay of left-right patterning cues from Hensen's node to the lateral plate mesoderm. *Dev Biol* 401, 236–248
- Crackower MA, Sinasac DS, Xia J, Motoyama J, Prochazka M, Rommens JM, Scherer SW, Tsui LC (1999): Cloning and characterization of two cytoplasmic dynein intermediate chain genes in mouse and human. *Genomics* 55, 257–267
- D'Angelo A, Franco B (2009): The dynamic cilium in human diseases. *Pathogenetics* 2, 3
- Dathe V, Gamel A, Manner J, Brand-Saber B, Christ B (2002): Morphological left-right asymmetry of Hensen's node precedes the asymmetric expression of *Shh* and *Fgf8* in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 205, 343–354
- Downs KM, Davies T (1993): Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118, 1255–1266
- Duboule D (1994): Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev Suppl.* 1994, 135–142
- Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, van Heyningen V, Jessell TM (1997): Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 451–466
- Essner JJ, Vogan KJ, Wagner MK, Tabin CJ, Yost HJ, Brueckner M (2002): Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 418, 37–38
- Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ (2005): Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247–1260
- Fan CM, Tessier-Lavigne M (1994): Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79, 1175–1186
- Feistel K: Determination of Laterality in the Rabbit Embryo: Studies on Ciliation and Asymmetric Signal Transfer. *Nat.-Wiss. Diss.* Universität Hohenheim 2006
- Feistel K, Blum M (2006): Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo. *Dev Dyn* 235, 3348–3358



- Feistel K, Blum M (2008): Gap junctions relay FGF8-mediated right-sided repression of Nodal in rabbit. *Dev Dyn* 237, 3516–3527
- Field S, Riley KL, Grimes DT, Hilton H, Simon M, Powles-Glover N, Siggers P, Bogani D, Greenfield A, Norris DP (2011): Pkd111 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2. *Development* 138, 1131–1142
- Fischer E, Pontoglio M (2009): Planar cell polarity and cilia. *Semin Cell Dev Biol* 20, 998–1005
- Florian J, Hill JP (1935): An Early Human Embryo (No. 1285, Manchester Collection), with Capsular Attachment of the Connecting Stalk. *J Anat* 69, 399–411
- Fox C, Manning ML, Amack JD (2015): Quantitative description of fluid flows produced by left-right cilia in zebrafish. *Methods Cell Biol* 127, 175–187
- Fujimi TJ, Hatayama M, Aruga J (2012): *Xenopus* Zic3 controls notochord and organizer development through suppression of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Dev Biol* 361, 220–231
- Geremek M, Bruinenberg M, Zietkiewicz E, Pogorzelski A, Witt M, Wijmenga C (2011): Gene expression studies in cells from primary ciliary dyskinesia patients identify 208 potential ciliary genes. *Hum Genet* 129, 283–293
- Gerhardt U, Ziegler HE, Woltereck R: Das Kaninchen, zugleich eine Einführung in die Organisation der Säugetiere (Monographien einheimischer Tiere / Heinrich Ernst Ziegler; Richard Woltereck Hrsg.; 2); Klinkhardt, Leipzig 1909
- Goetz SC, Anderson KV (2010): The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11, 331–344
- Gokey JJ, Dasgupta A, Amack JD (2015): The V-ATPase accessory protein Atp6ap1b mediates dorsal forerunner cell proliferation and left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol* 407, 115–130
- Gottschewski GHM ZW: Die Embryonalentwicklung des Hauskaninchens Normogenese und Teratogenese; verlag M. & H. Schaper, Hannover 1973
- Gray RS, Abitua PB, Wlodarczyk BJ, Szabo-Rogers HL, Blanchard O, Lee I, Weiss GS, Liu KJ, Marcotte EM, Wallingford JB et al. (2009): The planar cell polarity effector Fuz is essential for targeted membrane trafficking, ciliogenesis and mouse embryonic development. *Nat Cell Biol* 11, 1225–1232
- Gray RS, Roszko I, Solnica-Krezel L (2011): Planar cell polarity: coordinating morphogenetic cell behaviors with embryonic polarity. *Dev Cell* 21, 120–133
- Gros J, Feistel K, Viebahn C, Blum M, Tabin CJ (2009): Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick. *Science* 324, 941–944
- Guirao B, Meunier A, Mortaud S, Aguilar A, Corsi JM, Strehl L, Hirota Y, Desoeuvre A, Boutin C, Han YG et al. (2010): Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat Cell Biol* 12, 341–350

- Hadjantonakis AK, Pisano E, Papaioannou VE (2008): Tbx6 regulates left/right patterning in mouse embryos through effects on nodal cilia and perinodal signaling. *PLoS One* 3, e2511
- Hamada H, Tam PP (2014): Mechanisms of left-right asymmetry and patterning: driver, mediator and responder. *F1000Prime Rep* 6, 110
- Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW: Human embryology (Prenatal development of form and function). 1. Auflage; W. Heffer and Sons, Cambridge 1945
- Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW: Human embryology (Prenatal development of form and function). 4. Auflage; W. Heffer and Sons, Cambridge 1972
- Hammerschmidt M, Bitgood MJ, McMahon AP (1996): Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev* 10, 647–658
- Harrison RG: A Textbook of human embryology. 2. Auflage; Blackwell Scientific Publications, Oxford 1963
- Hashimoto M, Hamada H (2010): Translation of anterior-posterior polarity into left-right polarity in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 20, 433–437
- Hashimoto M, Shinohara K, Wang J, Ikeuchi S, Yoshida S, Meno C, Nonaka S, Takada S, Hatta K, Wynshaw-Boris A et al. (2010): Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nat Cell Biol* 12, 170–176
- Heuser CH: A study of the Implantation of the Ovum of the Pig from the stage of the Bilaminar Blastocyst to the Completion of the Fetal Membranes. Carnegie Institution Washington Publications 380, Washington 1927
- Heuser CH, Streeter GL: Early stages in the development of pig embryos, from the period of initial cleavage to the time of the appearance of the limb-buds. Carnegie Institution Washington Publications 394, Washington 1929
- Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E (2009): Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol* 20, 23–35
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y (2009): Left-right determination: involvement of molecular motor KIF3, cilia, and nodal flow. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000802
- Hjeij R, Onoufriadis A, Watson CM, Slagle CE, Klana NT, Dougherty GW, Kurkowiak M, Loges NT, Diggle CP, Morante NF et al. (2014): CCDC151 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disruption of the outer dynein arm docking complex formation. *Am J Hum Genet* 95, 257–274
- Ibanez-Tallon I, Gorokhova S, Heintz N (2002): Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus. *Hum Mol Genet* 11, 715–721

- Idkowiak J: Untersuchungen zu Signalzentren der Achsenbildung während der Gastrulation im Kaninchen. Med.-Diss. Halle, 2007
- Johnson RL, Laufer E, Riddle RD, Tabin C (1994): Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 79, 1165–1173
- Jurand A (1974): Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 32, 1–33
- Kaufmann MH: The Atlas of Mouse Development. Revised Edition; Academic Press, San Diego 1995
- Kaufmann MH, Bard J: The anatomical basis of mouse development. Academic Press, San Diego 1999
- Kawakami R, Dobi A, Shigemoto R, Ito I (2008): Right isomerism of the brain in inversus viscerum mutant mice. *PLoS One* 3, e1945
- Kawasumi A, Nakamura T, Iwai N, Yashiro K, Saijoh Y, Belo JA, Shiratori H, Hamada H (2011): Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into left-right asymmetry in the lateral plate of mouse embryos. *Dev Biol* 353, 321–330
- Kernan MJ (2007): Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflugers Arch* 454, 703–720
- Kinzel D, Boldt K, Davis EE, Burtscher I, Trumbach D, Diplas B, Attie-Bitach T, Wurst W, Katsanis N, Ueffing M et al. (2010): Pitchfork regulates primary cilia disassembly and left-right asymmetry. *Dev Cell* 19, 66–77
- Kölliker A: Die Entwicklung der Keimblätter des Kaninchens. Festschrift zur dritten Säkularfeier der Alma Mater Julia Maximiliana (Würzburg); Wilhelm Vogel, Leipzig 1882
- Krebs LT, Iwai N, Nonaka S, Welsh IC, Lan Y, Jiang R, Saijoh Y, O'Brien TP, Hamada H, Gridley T (2003): Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* 17, 1207–1212
- Lancaster MA, Schroth J, Gleeson JG (2011): Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. *Nat Cell Biol* 13, 700–707
- Larsen WJ: Human Embryology. 3. Auflage; Elsevier Science, Churchill Livingstone, New York 1993
- Lee JD, Anderson KV (2008): Morphogenesis of the node and notochord: the cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse. *Dev Dyn* 237, 3464–3476
- Leiber B, Olbrich G: Die klinischen Syndrome, 6. Auflage; p.539; Urban und Schwarzenberg, München 1957

- Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA (2009a): Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet Med* 11, 473–487
- Leigh MW, Zariwala MA, Knowles MR (2009b): Primary ciliary dyskinesia: improving the diagnostic approach. *Curr Opin Pediatr* 21, 320–325
- Levin M (2009): Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives. *Semin Cell Dev Biol* 20, 543–556
- Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, Mercola M (2002): Asymmetries in H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111, 77–89
- Logan M, Pagan-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ (1998): The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94, 307–317
- Loges NT, Olbrich H, Fenske L, Mussaffi H, Horvath J, Fliegauf M, Kuhl H, Baktai G, Peterffy E, Chodhari R et al. (2008): DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *Am J Hum Genet* 83, 547–558
- Manner J (2001): Does an equivalent of the "ventral node" exist in chick embryos?: A scanning electron microscopic study. *Anat Embryol (Berl)* 203, 481–490
- Maurus D, Kuhl M (2004): Getting an embryo into shape. *Bioessays* 26, 1272–1275
- McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003): Two Populations of Node Monocilia Initiate Left-Right Asymmetry in the Mouse. *Cell* 114, 61–73
- Mendes RV, Martins GG, Cristovao AM, Saude L (2014): N-cadherin locks left-right asymmetry by ending the leftward movement of Hensen's node cells. *Dev Cell* 30, 353–360
- Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A, Legendre M, Amirav I, Bataille G, Belmont J, Beydon N, Billen F, Clement A et al. (2011): CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat Genet* 43, 72–78
- Merzdorf CS (2007): Emerging roles for zic genes in early development. *Dev Dyn* 236, 922–940
- Mirzadeh Z, Han YG, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2010): Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci* 30, 2600–2610
- Mitchell B, Jacobs R, Li J, Chien S, Kintner C (2007): A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature* 447, 97–101
- Moore KL, Vidhya T, Persaud N: *Embryologie; Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik*. 5. Auflage; Urban & Fischer, München 2007

- Muller F, O'Rahilly R (2004): The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos. *Cells Tissues Organs* 177, 2–20
- Müller F, O'Rahilly R (2003): The Prechordal Plate, the Rostral End of the Notochord and Nearby Median Features in Staged Human Embryos. *Cells Tissues Organs* 173, 1–20
- Naganathan SR, Furthauer S, Nishikawa M, Julicher F, Grill SW (2014): Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left-right symmetry breaking. *Elife* 3, e04165
- Naganathan SR, Middelkoop TC, Furthauer S, Grill SW (2016): Actomyosin-driven left-right asymmetry: from molecular torques to chiral self organization. *Curr Opin Cell Biol* 38, 24–30
- Nakamura T, Hamada H (2012): Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms. *Development* 139, 3257–3262
- Nakaya MA, Biris K, Tsukiyama T, Jaime S, Rawls JA, Yamaguchi TP (2005): Wnt3a links left-right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation. *Development* 132, 5425–5436
- Narasimhan V, Hjeij R, Vij S, Loges NT, Wallmeier J, Koerner-Rettberg C, Werner C, Thamilselvam SK, Boey A, Choksi SP et al. (2015): Mutations in CCDC11, which encodes a coiled-coil containing ciliary protein, causes situs inversus due to dysmotility of monocilia in the left-right organizer. *Hum Mutat* 36, 307–318
- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H (2002): Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96–99
- Nonaka S, Yoshiba S, Watanabe D, Ikeuchi S, Goto T, Marshall WF, Hamada H (2005): De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol* 3, e268
- Norris DP, Brennan J, Bikoff EK, Robertson EJ (2002): The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development* 129, 3455–3468
- Odate T, Takeda S, Narita K, Kawahara T (2016): 9 + 0 and 9 + 2 cilia are randomly dispersed in the mouse node. *Microscopy (Oxf)* 65, 119–126
- Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, Izpisua Belmonte JC, Hirokawa N (2005): Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633–644
- Okumura Y, Sugiyama N, Tanimura S, Nishida M, Hamaoka K, Kohno M, Yokoyama T (2009): ERK regulates renal cell proliferation and renal cyst expansion in inv mutant mice. *Acta Histochem Cytochem* 42, 39–45

- Olbrich H, Haffner K, Kispert A, Volkel A, Volz A, Sasmaz G, Reinhardt R, Hennig S, Lehrach H, Konietzko N et al. (2002): Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet* 30, 143–144
- Omran H, Haffner K, Volkel A, Kuehr J, Ketelsen UP, Ross UH, Konietzko N, Wienker T, Brandis M, Hildebrandt F (2000): Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome 5p and identification of the heavy dynein chain DNAH5 as a candidate gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 696–702
- O'Rahilly R (1970): The Manifestation of the Axes of the Human Embryo. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 132, 50–57
- O'Rahilly R, Müller F (1987a): Human embryo. *Nature* 1-7:329(6158), 385
- O'Rahilly R, Müller F: Developmental stages in human embryos. Carnegie Institution of Washington, Washington 1987b
- O'Rahilly R, Müller F: Embryologie und Teratologie des Menschen, 1. deutsche Auflage; Verlag Hans Huber, Bern 1999
- O'Rahilly R, Müller F (2002): The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryos. *Teratology* 65, 162–170
- O'Rahilly R, Müller F: The embryonic human brain: An Atlas of Developmental Stages, 3. Auflage; Wiley-Liss John Wiley & Sons Inc., New York 2006
- O'Rahilly R, Müller F: Human Embryology and Teratology, 3. Auflage; Wiley-Liss John Wiley & Sons Inc., New York 2011
- Pearson CG (2011): A kinesin in command of primary ciliogenesis. *Cell* 145, 817–819
- Poelmann RE (1981): The head-process and the formation of the definitive endoderm in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* 162, 41–49
- Qiu D, Cheng SM, Wozniak L, McSweeney M, Perrone E, Levin M (2005): Localization and loss-of-function implicates ciliary proteins in early, cytoplasmic roles in left-right asymmetry. *Dev Dyn* 234, 176–189
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM (1995): Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445–455
- Roy S (2009): The motile cilium in development and disease: emerging new insights. *Bioessays* 31, 694–699
- Rüsse I, Sinowatz F: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 1. Auflage; Paul Parey bei Blackwell, Berlin 1991
- Sage DT: Experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der Entwicklungstätigkeit geklonter Schweineembryonen. Vet.-Diss. Hannover 2005

- Sampaio P, Ferreira RR, Guerrero A, Pintado P, Tavares B, Amaro J, Smith AA, Montenegro-Johnson T, Smith DJ, Lopes SS (2014): Left-right organizer flow dynamics: how much cilia activity reliably yields laterality? *Dev Cell* 29, 716–728
- Sander I: Beschreibung eines menschlichen Embryos der dritten Woche. Med.-Diss. Göttingen 2002
- Santos N, Reiter JF (2010): Tilting at nodal windmills: planar cell polarity positions cilia to tell left from right. *Dev Cell* 19, 5–6
- Sas KM, Janech MG, Favre E, Arthur JM, Bell PD (2011): Cilia movement regulates expression of the Raf-1 kinase inhibitor protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F1163-70
- Sausedo RA, Schoenwolf GC (1994): Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in mouse embryos. *Anat Rec* 239, 103–112
- Schatten H, Sun QY (2011): The significant role of centrosomes in stem cell division and differentiation. *Microsc Microanal* 17, 506–512
- Schneider H, Brueckner M (2000): Of mice and men: dissecting the genetic pathway that controls left-right asymmetry in mice and humans. *Am J Med Genet* 97, 258–270
- Schroder 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
- Schwabe GC, Hoffmann K, Loges NT, Birker D, Rossier C, Santi MM de, Olbrich H, Fliegau M, Faily M, Liebers U et al. (2008): Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Hum Mutat* 29, 289–298
- Shiratori H, Hamada H (2006): The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* 133, 2095–2104
- Sironen A, Kotaja N, Mulhern H, Wyatt TA, Sisson JH, Pavlik JA, Miiluniemi M, Fleming MD, Lee L (2011): Loss of SPEF2 function in mice results in spermatogenesis defects and primary ciliary dyskinesia. *Biol Reprod* 85, 690–701
- Skeik N, Jabr FI (2011): Kartagener syndrome. *Int J Gen Med* 4, 41–43
- Smith JL, Schoenwolf GC (1989): Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *J Exp Zool* 250, 49–62
- Song H, Hu J, Chen W, Elliott G, Andre P, Gao B, Yang Y (2010): Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature* 466, 378–382
- Starck D: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere; pp.39-272; Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1982
- Stern CD (2002): Embryology: fluid flow and broken symmetry. *Nature* 418, 29–30

- Streeter GL: Development of the mesoblast and notochord in pig embryos (380 Contributing embryo No 19); Carnegie Institutes Washington Publications, Washington 1927
- Sulik K, Dehart DB, Iangaki T, Carson JL, Vrablic T, Gesteland K, Schoenwolf GC (1994): Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn* 201, 260–278
- Supp DM, Witte DP, Potter SS, Brueckner M (1997): Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* 389, 963–966
- Supp DM, Brueckner M, Kuehn MR, Witte DP, Lowe LA, McGrath J, Corrales J, Potter SS (1999): Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* 126, 5495–5504
- Tan SY, Rosenthal J, Zhao XQ, Francis RJ, Chatterjee B, Sabol SL, Linask KL, Bracero L, Connelly PS, Daniels MP et al. (2007): Heterotaxy and complex structural heart defects in a mutant mouse model of primary ciliary dyskinesia. *J Clin Invest* 117, 3742–3752
- Tasouri E, Tucker KL (2011): Primary cilia and organogenesis: is Hedgehog the only sculptor? *Cell Tissue Res* 345, 21–40
- Theiler K: The house mouse: atlas of embryonic development. Springer Verlag, New York 1989
- Torlopp A, Khan MA, Oliveira NM, Lekk I, Soto-Jimenez LM, Sosinsky A, Stern CD (2014): The transcription factor *Pitx2* positions the embryonic axis and regulates twinning. *Elife* 3, e03743
- 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. *Differentiation*, 84, 380–391
- van Straaten HW, Hekking JW, Wiertz-Hoessels EJ, Thors F, Drukker J (1988): Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 177, 317–324
- Vandenberg LN, Levin M (2009): Perspectives and open problems in the early phases of left-right patterning. *Semin Cell Dev Biol* 20, 456–463
- Vandenberg LN, Levin M (2010): Far from solved: a perspective on what we know about early mechanisms of left-right asymmetry. *Dev Dyn* 239, 3131–3146
- Varlet I, Robertson EJ (1997): Left-right asymmetry in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 7, 519–523
- Vick P, Schweickert A, Weber T, Eberhardt M, Mencl S, Shcherbakov D, Beyer T, Blum M (2009): Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 331, 281–291



- Viebahn C: Gastrulation in the rabbit. In: Stern CD (Hrsg.) Gastrulation. From cells to embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2004, 263-274
- Vladar EK, Axelrod JD (2008): Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends Cell Biol* 18, 517–520
- von Baer KE: Über Entwicklungsgeschichte der Thiere; Beobachtungen und Reflexion, Königsberg 1828
- von Hensen V (1876): Beobachtungen über die Befruchtung und entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklung* 1, 213–271
- Wallingford JB, Mitchell B (2011): Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev* 25, 201–213
- Walter I, Tschulenk W, Budik S, Aurich C (2010): Transmission electron microscopy (TEM) of equine conceptuses at 14 and 16 days of gestation. *Reprod Fertil Dev* 22, 405–415
- Wedlich D (2002): The polarising role of cell adhesion molecules in early development. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 563–568
- Wehner R, Gehring W: Zoologie: Glossar mit 830 Stichworten, 25., vollständig überarbeitete Auflage; pp.645-707; Thieme, Stuttgart, New York 2013
- Weissenberg R: Entwicklungsgeschichte des Menschen mit Berücksichtigung der Wirbeltiere, 11. Auflage; Georg-Thieme-Verlag, Leipzig 1929
- Welsh IC, Kwak H, Chen FL, Werner M, Shopland LS (2015): Chromatin architecture of the Pitx2 locus requires CTCF and Pitx2 dependent asymmetry that mirrors embryonic gut laterality. *Cell Rep.*, 337–349
- Westheide W: Spezielle Zoologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2005
- Wibowo I, Pinto-Teixeira F, Satou C, Higashijima S, Lopez-Schier H (2011): Compartmentalized Notch signaling sustains epithelial mirror symmetry. *Development* 138, 1143–1152
- Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG (1990): Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657–659
- Wilson CW, Nguyen CT, Chen MH, Yang JH, Gacayan R, Huang J, Chen JN, Chuang PT (2009): Fused has evolved divergent roles in vertebrate Hedgehog signalling and motile ciliogenesis. *Nature* 459, 98–102
- Yamanaka Y, Tamplin OJ, Beckers A, Gossler A, Rossant J (2007): Live imaging and genetic analysis of mouse notochord formation reveals regional morphogenetic mechanisms. *Dev Cell* 13, 884–896
- Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ (2002): Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* 129, 2507–2517

Zaghloul NA, Brugmann SA (2011): The emerging face of primary cilia. *Genesis* 49, 231–246

Zhang Y, Levin M (2009): Left-right asymmetry in the chick embryo requires core planar cell polarity protein Vangl2. *Genesis* 47, 719–728

Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL, Kuehn MR (1993): Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543–547

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Viebahn, Leiter der Abteilung Anatomie und Embryologie am Zentrum Anatomie der Universitätsmedizin Göttingen für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit der Nutzung der Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Bernd Püschel für seine herausragende Unterstützung bei der Planung der Experimente und deren Durchführung sowie die Vielzahl an Stunden der Hilfestellung bei methodischen Problemen danken. Herrn Dr. med. Nikoloz Tsikolia danke ich für die enge Zusammenarbeit bei der Durchführung von Experimenten und bei der Ausarbeitung zur Veröffentlichung der Daten.

Ihnen sei für die umfangreiche Hilfe und die vielen Stunden gedankt, die sie in meine Arbeit investiert und damit zu ihrer Fertigstellung beigetragen haben.

Mein besonderer Dank für die methodische Einarbeitung und praktische Unterstützung bei der experimentellen Arbeit ebenso wie bei der Herstellung der Schnittpräparate gilt Frau Kirsten Falk-Stietenroth, Frau Heike Faust und Frau Irmgard Weiss sowie Herrn Hannes Sydow. Herrn Hannes Sydow sei ebenfalls herzlich für die Hilfe bei EDV-Schwierigkeiten gedankt. Für die Einführung in die Mikroskopie und anregende Diskussionen danke ich Herrn Dr. med. Peter Schwartz. Herrn PD Dr. med. Jörg Männer danke ich für die zahlreichen inhaltlichen Debatten, die stets neue Aspekte beleuchteten. Den Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Anatomie und Embryologie sei herzlich für die tolle Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank Frau Heike Altmann, Frau Gabriele Schmidt, und Frau Anja Aue für die Unterstützung in administrativen Fragen.