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

Morphologische und molekulare Untersuchungen zur Rechts-Links-Symmetriebrechung in Hühnerembryonen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Tobias Karl Pieper

aus

Höxter

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück Referent/in Prof. Dr. med. C. Viebahn Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. R. Behr

Datum der mündlichen Prüfung: 25.02.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Morphologische und molekulare Untersuchungen zur Rechts-Links-Symmetriebrechung in Hühnerembryonen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

- Otto A, Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N (2014): Early left-right asymmetries during axial morphogenesis in the chick embryo. Genesis 2000 <u>52</u>, 614–625
- Pieper T, Carpaij M, Reinermann J, Surchev L, Viebahn C, Tsikolia N (2019): Matrix-filled microcavities in the emerging avian left-right organizer. Dev Dyn (im Druck)
- Sydow H-G, Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N: An Early Chick Embryo Culture Device for Extended Continuous Observation; In: Sheng G (Hrsg.): Avian and Reptilian Developmental Biology: Methods and Protocols; Springer New York, New York, NY 2017, 309–317

Inhaltsverzeichnis

AbbildungsverzeichnisIV			
TabellenverzeichnisV			
Abküı	AbkürzungsverzeichnisVI		
1	Einleitung	1	
1.1	Der Hensen-Knoten	2	
1.2	Die Entwicklung der asymmetrischen Morphologie	3	
1.3	Mechanismen der Rechts-Links-Differenzierung	7	
1.3.1	Die Zilienstrom-Hypothese	9	
1.3.2	Die Ionenfluss-Hypothese		
1.4	Symmetriebrechung in Hühnerembryonen	14	
1.4.1	Frühe morphologische Asymmetrien	15	
1.4.2	Frühe molekulare Asymmetrien	16	
1.4.3	Asymmetrische Zellbewegungen		
1.5	Ziele dieser Arbeit	20	
2	Methoden	21	
2.1	Embryologische Methoden	21	
2.1.1	Explantation von Hühnerembryonen	21	
2.1.2	Kultivierung von Hühnerembryonen	22	
2.1.3	Behandlung kultivierter Embryonen	24	
2.1.4	Membrandepolarisationsmessungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3)	25	
2.1.5	Fixierung und Lagerung der Keimscheiben		
2.2	Molekularbiologische Methoden		
2.2.1	Gewinnung von RNA aus Gewebe	26	
2.2.2	Herstellung von cDNA	27	
2.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	27	
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	27	
2.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten		
2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten		
2.2.7	Herstellung elektrisch kompetenter DH5a-Bakterien		
2.2.8	Elektrische Transformation von DH5α-Bakterien	29	
2.2.9	Anzucht transformierter DH5α-Bakterien	29	
2.2.10	Präparation von Plasmid-DNA		
2.2.11	DNA-Sequenzierung		
2.2.12	Anlegen eines Glycerol-Bakterienstocks		
2.2.13	Herstellung einer cRNA-Sonde		
2.2.14	In-situ-Hybridisierung		

2.3	Histologische und mikroskopische Methoden	33
2.3.1	Herstellung von Technovit®-Schnitten	33
2.3.2	Herstellung von Semidünnschnitten	34
2.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	35
2.3.4	Rasterelektronenmikroskopie	35
2.3.5	Live-imaging	36
2.3.6	Immunfluoreszenzfärbung ganzer Keimscheiben	36
2.3.7	Immunhistochemische Färbung ganzer Keimscheiben	
2.4	Verwendete Programme	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Zilienassoziierte Aspekte der Symmetriebrechung	
3.1.1	Rasterelektronenmikroskopie der entstehenden Asymmetrie im Hensen-Knoten	
3.1.2	Lebendbeobachtung (live-imaging) der Knotendrehung	40
3.1.3	Matrixgefüllte Interzelluarräume (sog. nodal microcavities) im Hensen-Knoten	42
3.1.4	Expressionsmuster des Mastergens für motile Zilien Foxj1	55
3.1.5	Expressionsmuster des Rechts-Links-Dyneins	56
3.2	Komponenten der Ionenfluss-Hypothese	58
3.2.1	Klonierung der ATP4a-Sonde	58
3.2.2	Expressionsmuster der ATP4	59
3.2.3	Membrandepolarisationsmuster in den Stadien HH 3+ bis HH 4+	64
3.2.4	Nodal-Expression nach pharmakologischer Unterdrückung der ATP4-Aktivität mit SCH28080	66
3.3	Abhängigkeit der <i>Faxil</i> -Expression von ATP4	
3.3.1	<i>Faxi1</i> -Expression nach Behandlung mit SCH28080	
3.3.2	<i>Nodal</i> -Expression nach Wnt-Inhibition mit LGK-974 und Wnt-5C9	68
3 /	Shh Inhibition mit Cyclonamin	60
5.4		07
4	Diskussion	71
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4.2	Methodisches	72
4.3	Zilienassoziierte Aspekte	77
4.3.1	Nodal microcavities im Hensen-Knoten der Gastrulationsstadien	77
4.3.2	Expression zilienassoziierter Gene	81
4.4	ATP4-assoziierte Aspekte der Rechts-Links-Symmetriebrechung des Huhns	82
4.5	Ausblick	85
5	Zusammenfassung	86
6	Anhang	87
6.1	Listen der verwendeten Geräte und Materialien	87
6.1.1	Verwendete Geräte	87
6.1.2	Verbrauchsmaterialien	88
6.1.3	Chemikalien	89
6.1.4	Enzyme	92
6.1.5	Antikörper	92

7	Literaturverzeichnis	98
6.2	Alignment der klonierten ATP4a_Gg-Sonde	97
6.1.9	cRNA-Sonden	93
6.1.8	Bakterien und Vektoren	93
6.1.7	Primer	93
6.1.6	Kits	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklung des Hensen-Knotens	5
Abb. 2: Knotenasymmetrie in Semidünnschnitten	16
Abb. 3: Kulturschale aus Aluminium mit Spannungsring	23
Abb. 4: Durchlicht-Kulturschale	24
Abb. 5: Hensen-Knoten und axiales Mesoderm in der Rasterelektronenmikroskopie	
Abb. 6: Entstehung der Knotenasymmetrie im <i>live-imaging</i>	41
Abb. 7: Matrixgefüllte Gewebelücke	43
Abb. 8: Nodal microcavities im Hensen-Knoten	44
Abb. 9: Nodal microcavities in transversalen und sagittalen Semidünnschnitten	45
Abb. 10: Nodal microcavities in der Transmissionselektronenmikroskopie	47
Abb. 11: Nodal microcavity in der Rasterelektronenmikroskopie	49
Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung gegen Fibronektin, Perlecan und Fibrillin-2 an ganzen Embryonen	51
Abb. 13: Immunhistochemische Färbung gegen Fibronektin an einer ganzen Keimscheibe	54
Abb. 14: Foxj1-Expression in Embryonen der Stadien HH 3+ bis HH 5	55
Abb. 15: Rechts-Links-Dynein-Expression in den Stadien HH 3+ bis HH 8	57
Abb. 16: ATP4a-PCR. Agarosegelektrophorese der PCR-Produkte der ATP4a-PCR	58
Abb. 17: Agarosegelektrophorese der ATP4a-Sonde nach In-vitro-Transkription	59
Abb. 18: ATP4-Expression in Embryonen den Stadien HH 1 bis 5 und HH 10	60
Abb. 19: ATP4a-Expression in Stadium HH 32	63
Abb. 20: Membrandepolarisationsmuster in den Stadien HH 3+ bis HH 4+	65
Abb. 21: Nodal-Expression nach Behandlung mit SCH28080	67
Abb. 22: Nodal-Expression nach Wnt-Inhibition	69
Abb. 23: <i>Nodal</i> - und <i>Brachyury</i> -Expression und Herzschleifenbildung nach Behandlung mit Cyclopamin	70
Abb. A1: Alignment der Sequenzierungsergebnisse zur erwarteten Sequenz der ATP4a-Sonde	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nodal-Expression nach Behandlung mit SCH28080	67
Tabelle 2: Faxj1-Expression nach Behandlung mit SCH28080	68
Tabelle 3: Nodal-Expression nach Wnt-Inhibition	68
Tabelle A1: Liste der verwendeten Geräte	
Tabelle A2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	
Tabelle A3: Liste der verwendeten Chemikalien	89
Tabelle A4: Liste der verwendeten Enzyme	92
Tabelle A5: Liste der verwendeten Antikörper	92
Tabelle A6: Liste der verwendeten Kits	93
Tabelle A7: Liste der verwendeten Primer	93
Tabelle A8: Liste der verwendeten Bakterien und Vektoren	93
Tabelle A9: Liste der verwendeten cRNA-Sonden	93

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
cRNA	Copy-Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiBAC4	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ЕМТ	Epithelial-mesenchymale Transition
FGF8	fibroblast growth factor 8
GFP	green fluorescent protein
LB	lysogeny broth
MABT	maleic acid buffer containing Tween 20
MOPS	
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NGS	normal goat serum
NMC	nodal microcavity
PBS	phosphate-buffered saline
PBT	PBS mit 0,1% Tween 20
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
shh	sonic hedgehog

Die äußerliche bilaterale Symmetrie der Wirbeltiere wird im Inneren von einer bilateralen Asymmetrie in der Transversalebene begleitet. Das Herz, beispielsweise, liegt bei höheren Wirbeltieren auf der linken, die Leber auf der rechten Körperseite. Die Asymmetrie des adulten Organismus wird bereits während der frühen Embryonalentwicklung etabliert und geht wahrscheinlich auf die Brechung eines initial morphologisch und molekular symmetrischen Bauplans zurück. Die Brechung dieser initialen Symmetrie beginnt in den meisten Spezies mit der Brechung der molekularen Symmetrie, die später in der Asymmetrie der Organanlagen resultiert. Bei der Brechung der bilateralen Symmetrie bildet sich die Rechts-Links-Körperachse als dritte und letzte der Hauptkörperachsen. Als erstes entwickelt sich bei den höheren Wirbeltieren durch die Differenzierung des dorsal liegenden Epiblast und des ventral liegenden Hypoblast die dorsoventrale Achse oder Sagittalachse. Als zweites wächst im Rahmen der Gastrulation von einer Stelle am Rand des embryonalen Gewebes der Primitivstreifen aus. Diese Stelle definiert den posterioren Pol des Embryos. Da der Primitivstreifen zum gegenüberliegenden Pol auswächst, ist an seinem Verlauf bereits die spätere kraniokaudale oder Longitudinalachse erkennbar. In dieser dorsoventral und kraniokaudal fixierten Körperanlage ist die Transversalachse, und damit auch die rechte und linke Seite des Körpers, aus geometrischen Gründen zwar festgelegt, die Anordnung der asymmetrischen inneren Organanlagen auf der rechten oder linken Seite der Transversalachse ist jedoch noch offen. Für diese Festlegung sind in verschiedenen Spezies Gewebe oder Zellgruppen beschrieben worden, denen die Funktion des Rechts-Links-Organisators zugeschrieben werden. Auf den Zellen des Organisators wurden bei Fischen, Fröschen und Mäusen bewegliche Zilien identifiziert. Diese Zilien führen durch rotierende Bewegungen zu einem immer gleichsinnig gerichteten Flüssigkeitsstrom auf frei liegenden Zelloberflächen, der die einseitige Expression bestimmter Schlüsselgene, beispielsweise Nodal, in unmittelbarer Nähe des Organisators induzieren soll (Zilienstrom-Hypothese). Genetische Mutationen einiger zilienassoziierter Proteine wie Dyneinen bei Mensch und Maus liefern die bisher schlüssigsten Hinweise für diese Theorie, da sie zu Fehlbildungen der Rechts-Links-Differenzierung bis hin zur vollständigen Umkehrung der Organe - dem Situs inversus totalis - führen. Beim Huhn und einigen Säugetierspezies wie dem Schwein konnten jedoch Zilien an deren Organisatorgeweben bisher nicht gefunden werden. Alternativ zur Zilienstrom-Hypothese könnte daher bei Hühner- (und Xenopus-)Embryonen die Ionenfluss-Hypothese greifen, nach der positiv geladene Teilchen über benachbarte Zellgrenzen hinweg gerichtet in der Transversalebene transportiert und so auf einer Seite des Embryos konzentriert werden. Diese erhöhte Ionenkonzentration könnte daraufhin über bisher unbekannte Mechanismen zur einseitigen Expression des Gens Nodal führen. Unabhängig von diesen funktionellen Modellen ist gerade beim Huhn eine sehr frühe morphologische Asymmetrie des Hensen-Knotens bekannt. Diese morphologische Symmetriebrechung geht der asymmetrischen Expression von *Nodal* voraus und steht damit im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Fischen, Fröschen und Mäusen, bei denen als erste morphologische Asymmetrie die sich einseitig windende Herzschleife gilt. Im Huhn wird diese morphologische Symmetriebrechung von asymmetrischen Zellbewegungen im Bereich des Primitivknotens begleitet. Die nachfolgenden Kapitel der Einleitung beschreiben deshalb zunächst die Morphologie, Entstehung und Entwicklung des nach Hensen benannten Primitivknotens und danach die funktionellen Überlegungen für die Entstehung der Rechts-Links-Asymmetrie.

1.1 Der Hensen-Knoten

Der Hensen-Knoten (Hensen 1876; Viebahn 2001), der auch als Primitivknoten bezeichnet wird, bildet sich im Huhn als Verdichtung am vorderen Ende des Primitivstreifens (Baer 1828). Der Primitivstreifen, der die früheste embryonale kraniokaudale Achsenstruktur darstellt, und damit auch der Hensen-Knoten, werden der oberflächlichen Zellschicht des Embryos zugeordnet - dem Epiblast. Seine Zellen zeigen epithelialen Charakter, sind also polar gebaut und sitzen einer Basalmembran auf. Der Epiblast wird ventral von den Zellen des Hypoblast bedeckt (Eyal-Giladi et al. 1992; Bertocchini und Stern 2002). Noch bevor der Primitivstreifen entsteht, wird durch die Bildung von Epiblast und Hypoblast die erste embryonale Achse, die dorsoventrale Achse, definiert. Zwischen diesen beiden Zellschichten, die nur an ihren Rändern miteinander verbunden sind, liegt formal eine embryonale Höhle, die als Blastozöl bezeichnet wird (Gilbert 2000). Im Primitivstreifen und im Hensen-Knoten differenzieren sich die epithelialen Zellen um, erlangen mesenchymalen, also unpolarisierten Charakter, und verlieren ihren Bezug zur Basalmembran. Diese wird im Primitivstreifen und im Hensen-Knoten unterbrochen. So können die entstehenden Mesodermzellen zwischen die beiden Zellschichten, oder Keimblättern, der bisher zweiblättrigen Keimscheibe abtauchen und das mittlere im Blastozöl liegende dritte Keimblatt bilden – das Mesoderm. Die dreiblättrige Keimscheibe entsteht. Der Prozess der Umdifferenzierung im Primitivstreifen und im Hensen-Knoten wird auf zellulärer Ebene als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet (Kalluri und Weinberg 2009; Nakaya und Sheng 2009; Nakaya und Sheng 2013). Auf den ganzen Embryo bezogen spricht man bei der Bildung der dreiblättrigen Keimscheibe von Gastrulation (Haeckel 1874; Keller et al. 1991; Stern 2004). Parallel zur Bildung des Mesoderm verlassen weitere Zellen den Verband des Epiblast, um ventral des Mesoderm das Endoderm zu bilden (Lawson und Schoenwolf 2003). Diese Zellen ersetzen den vorher gebildeten Hypoblast vollständig. So entstammen alle Zellen, die den definitiven Embryo bilden, letztlich dem Epiblast (Rosenquist 1966; Rosenquist 1972). Alle Zellen, die im Lauf der Embryonalentwicklung nicht entweder die EMT durchlaufen, um zu Zellen des Mesoderm zu differenzieren oder das Endoderm bilden, werden dem Ektoderm zugeordnet.

Auf Basis histologischer Schnitte durch den Hensen-Knoten wurde dieser durch seine enge Verzahnung der drei Keimblätter miteinander charakterisiert, wobei sich diese hier nicht klar voneinander abgrenzen lassen (Kölliker 1879; Rabl 1897). Funktionell kommt dem Hensen-Knoten die Rolle des sogenannten Organisators zu. Dieser Begriff wurde für Molch-Embryonen der Gattung Triturus für die dorsale Urmundlippe geprägt. Eine Transplantation der dorsalen Urmundlippe auf einen zweiten Triturus-Embryo führt zur Induktion einer neuen zweiten embryonalen kraniokaudalen Achse (Spemann und Mangold 1924). Da auch eine Transplantation des Hensen-Knotens vom Huhn in einen zweiten (Hühner-)Embryo zur Bildung einer zweiten Achse führt, werden beide Gewebe als homolog angesehen (Boettger et al. 2003). Die Identifikation des Hensen-Knotens als Organisator gelang als erstes in Hühnerembryonen, sodass dies die erste Spezies war, in der das Prinzip des Organisators für einen Amnioten beschrieben wurde (Waddington und Schmidt 1933). Auch in Mausembryonen kann der vorderste Teil des Primitivstreifens nach seiner Transplantation auf einen zweiten Embryo dort eine zweite Achse induzieren (Beddington 1994). Somit ist auch der Hensen-Knoten der Maus als homolog zum Hensen-Knoten des Huhns und zur dorsalen Urmundlippe des Molches zu betrachten. Im Hensen-Knoten des Huhns und in der dorsalen Urmundlippe der Amphibien werden als weiterer Hinweis für deren Homologie außerdem die gleichen Gene exprimiert. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um Goosecoid (Izpisúa-Belmonte et al. 1993; Psychoyos und Stern 1996), Noggin (Smith und Harland 1992; Streit und Stern 1999), Chordin (Sasai et al. 1994; Chapman et al. 2002) und Sonic Hedgehog (shh, Johnson et al. 1994; Otto et al. 2014). Den Produkten dieser Gene wird teilweise Morphogencharakter zugeschrieben. Morphogene sind parakrin wirkende Gewebshormone, die in ihrer Wirkung zur morphologischen Entwicklung und Differenzierung der Zielzellen beitragen (Wolpert 1969; Christian 2012). Ein morphogenetischer Prozess, der direkt im Knoten stattfindet, ist die Bildung des sogenannten axialen Mesoderm. Dazu werden alle mesodermalen Strukturen gezählt, die im Embryo in der Mittellinie anterior des Hensen-Knotens liegen. Dies sind unter anderem die Chorda dorsalis und das prä- und subchordale Mesoderm. Diese Strukturen entstehen aus denjenigen Epiblastzellen, die direkt im Hensen-Knoten eine EMT durchlaufen und anschließend Richtung anterior auswandern (Rosenquist 1983; Selleck und Stern 1991).

1.2 Die Entwicklung der asymmetrischen Morphologie

Die Embryonalentwicklung des Huhns wird in Stadien eingeteilt, die nach morphologischen Kriterien definiert sind (Stern 2018). In allen Stadien ist die durchscheinende *Area pellucida*, die das embryonale Gewebe enthält, von der *Area opaca* umgeben (Pander 1817). Diese stellt das extraembryonale Gewebe dar. Zusammengenommen werden beide Bereiche als Keimscheibe bezeichnet. Diese liegt zwischen der Dottermembran, die das gesamte Eigelb des Eis umgibt, und dem Dotter. In den frühen Embryonalstadien erfolgt die Einteilung der Stadien vor allem nach der Morphologie des Primitivstreifens und des Hensen-Knotens (Hamburger und Hamilton 1951; Selleck und Stern 1991; Tsikolia et al. 2012). In den ersten

Entwicklungsstadien kommt bei jedem nächsthöheren Stadium eine morphologische Eigenschaft hinzu, wodurch sich eine grobe Einteilung ergibt. Diese Einteilung wird nach Hamburger und Hamilton vorgenommen und mit der Abkürzung HH angegeben. Die Bezeichnung Stadium HH 4 steht so beispielsweise für einen Embryo in Stadium 4.

In Stadium HH 1 findet sich eine rundliche Keimscheibe mit einer kreisrunden *Area pellucida*, die sich kaum weiter differenzieren lässt. Stadium HH 2 ist durch erste Anzeichen des Primitivstreifens am dann erkennbaren posterioren Embryonalpol gekennzeichnet. In Stadium HH 3 differenziert sich der Primitivstreifen weiter. In Stadium HH 4 bildet sich an seinem vorderen Ende der Hensen-Knoten. In Stadium HH 5 wächst aus diesem die *Chorda dorsalis* als zweite embryonale Achsenstruktur aus. In Stadium HH 6 bildet sich die Kopffalte und ab Stadium HH 7 bilden sich aus dem paraxialen Mesoderm entlang der *Chorda dorsalis* die Somiten, die sich in der weiteren Entwicklung zu verschiedenen Bestandteilen des Bewegungsapparates differenzieren (Hamburger und Hamilton 1951). Die meisten dieser Stadien lassen sich anhand morphologischer Gesichtspunkte weiter unterteilen, sodass feinere Stadierungssysteme entwickelt wurden (Eyal-Giladi und Kochav 1976; Schoenwolf et al. 1992). Diese werden allerdings insbesondere in Bezug auf die Stadien HH 3 bis HH 5 recht unterschiedlich angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt eine Orientierung vor allem an der Arbeit von Stern (Stern 2004). In Abb. 1 sind beispielhaft Embryonen dargestellt, um die Kriterien für die Stadierung zu veranschaulichen.



Abb. 1: Entwicklung des Hensen-Knotens. (A-E) Übersichtsaufnahmen von Hühnerembryonen in den Stadien HH 3+ bis HH 5. (A'-E') Vergrößerte Darstellungen des Hensen-Knotens, Anordnung nach der relativen Distanz des Vorderendes des Primitivstreifens zum vorderen Rand der *Area pellucida*. Der Maßstabsbalken in E' gibt für die Abbildungsteile A-E eine Länge von 570 µm und für A'-E' eine Länge von 200 µm an. Die gekreuzten Pfeile in A geben die Orientierung der Keimscheibe an. a: anterior, p: posterior, l: links, r: rechts (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

In Stadium HH 3+ (Abb. 1A, A^o) ist der Primitivstreifen als Achsenstruktur des frühen Embryos deutlich in der Mittellinie erkennbar und erstreckt sich über etwa 2/3 der Gesamtlänge der *Area pellucida*. Er besteht aus zwei parallel angeordneten streifenförmigen Zellansammlungen höherer Dichte, zwischen denen sich eine weniger zelldichte Region befindet. Diese wird als Primitivrinne bezeichnet. Sie ist das morphologische Kriterium, das die Abgrenzung zu Stadium HH 3 ermöglicht. So hat sich in Stadium HH 3 noch keine Primitivrinne im Primitivstreifen gebildet (keine Abbildung). Das vordere Ende des Primitivstreifens ist (noch) undifferenziert und lediglich unscharf gegenüber dem umliegenden Epiblast abgrenzbar (Abb. 1A^o). Die Breite des Primitivstreifens nimmt an seinem vorderen Ende, der Position des sich dann bildenden Hensen-Knotens, nicht zu (Selleck und Stern 1991).

In Stadium HH 4 (Abb. 1B, B[•]) hat sich am vorderen Ende des Primitivstreifens eine hufeisenförmige, mit seiner Öffnung nach posterior gerichtete, gegenüber dem umliegenden Epiblast abgrenzbare Verdichtung gebildet – der Hensen-Knoten (s. 1.1). Durch ihn wird

das voll entwickelte Stadium HH 4 definiert. Er ist etwas breiter als der Primitivstreifen. Außerdem zeigt er eine morphologische bilaterale Symmetrie. In der Mitte des Hensen-Knotens liegt die Primitivgrube. Ihre kraniokaudale Längsachse geht in einer geraden Linie in die sich posterior anschließende Primitivrinne über. Der Primitivstreifen hat sich gegenüber dem Stadium HH 3+ deutlich verlängert. Das bereits ausgewanderte Mesoderm ist noch undifferenziert. Einzelne Domänen des Mesoderm lassen sich in der Übersicht morphologisch nicht voneinander unterscheiden (Streit und Stern 2008).

In Stadium HH 4+ (Abb. 1C, C⁶) hat die rechte Domäne des Hensen-Knotens begonnen sich zu verdichten und bildet die rechte Knotenschulter (Tsikolia et al. 2012). Der Knoten ist breiter als der Primitivstreifen. Er befindet sich in diesem Stadium an seiner maximal anterioren Position, da der Primitivstreifen in diesem Stadium seine maximale kraniokaudale Ausdehnung erreicht. Auch das Mesoderm beginnt sich morphologisch zu differenzieren. Das axiale Mesoderm vor dem Knoten ist als zelluläre Wolke sichtbar. In manchen Studien wird es als dreieckig mit breiter, zum Knoten gerichteter Basis beschrieben (beispielsweise Stern 2018). Es ist nicht scharf vom umliegenden Mesoderm abgrenzbar. Dieses bereits gebildete axiale Mesoderm wird in den folgenden Chordastadien als prächordales Mesoderm bezeichnet (Seifert et al. 1993).

Stadium HH 5- (Abb. 1D, D') ist durch das beginnende Auswachsen der Chorda dorsalis definiert, die sich vom umliegenden Mesoderm abgrenzen lässt. Sie entsteht als weitere Struktur des axialen Mesoderm aus Epiblastzellen, die im Hensen-Knoten die EMT durchlaufen und nach anterior auswandern. In Stadium HH 5 (Abb. 1E, E') ist die Chorda dorsalis als stabförmige, zelldichte Struktur vor dem Hensen-Knoten zu erkennen und wird durch Areale mit geringerer Zelldichte zu beiden Seiten flankiert (Tsikolia et al. 2012). Ihre Form ist dreieckig mit einer schmalen zum Knoten gerichteten Basis. Der Hensen-Knoten ist in diesem Stadium zur linken Seite verdreht, sodass die nun dichtere rechte Knotenschulter anterior der linken Knotenschulter zu liegen kommt. Dies ist auch an einem Knick zwischen den Längsachsen von Primitivrinne und Primitivgrube erkennbar. Der sich anterior zwischen deren Achsen bildende Winkel beträgt etwa 45°. Die weiter anterior liegende rechte Knotenschulter geht in die Chorda dorsalis über, wohingegen die weiter posterior liegende linke Knotenschulter keine räumliche Beziehung zur Chorda dorsalis zeigt. Die beiden Knotenschultern sind durch einen weniger dichten Bereich vollständig voneinander getrennt (Abb. 1E). Außerdem beginnt die Knotenregression, bei der sich der Hensen-Knoten entlang des Primitivstreifens immer weiter vom Vorderrand der Area pellucida entfernt. Dadurch wird der Primitivstreifen kürzer, während die zeitgleich auswachsende Chorda dorsalis länger wird. Dies wird in der Anordnung der vergrößerten Knotenausschnitte in Abb. 1 A'-E' deutlich. Der Hensen-Knoten ist auf allen Ausschnitten in Relation zum Vorderende der Area pellucida ausgerichtet. Somit wird deutlich, dass sich der Primitivstreifen zunächst bis Stadium HH 4+ verlängert und mit Beginn der Bildung der Chorda dorsalis in Stadium HH 5- verkürzt. Da der Hensen-Knoten das Vorderende des Primitivstreifens bildet, kommt es zur Knotenregression (Spratt 1947; Carpaij 2014).

In der weiteren Entwicklung induziert die *Chorda dorsalis* die Bildung des Neuroektoderm und somit des Neuralrohrs ab Stadium HH 7. Die Stadien der Neuralrohrbildung werden als Neurulationsstadien bezeichnet. Bei den vorherigen Stadien von Stadium HH 3 bis HH 5 spricht man von Gastrulationsstadien (Keller et al. 1991; Stern 2004).

Zusammenfassend werden dem Hensen-Knoten des Huhns drei wesentliche funktionelle Eigenschaften und Attribute zugeschrieben:

1) Im Knoten werden viele Gene exprimiert, deren Genprodukte Morphogen-Charakter haben und in anderen Spezies der Organisator-Funktion zugeordnet werden.

2) Der Knoten wird von Zellen durchwandert, die nach ihrer epithelial-mesenchymalen Transition das axiale Mesoderm bilden.

3) Der Knoten des Huhns zeigt die ersten Anzeichen für eine asymmetrische Morphologie.

1.3 Mechanismen der Rechts-Links-Differenzierung

Morphologische und funktionelle Asymmetrien entlang der Rechts-links-Körperachse sind ein universelles Phänomen der Wirbeltiere und auch vieler wirbelloser Organismen. Solche Asymmetrien treten in verschiedenen Organsystemen wie dem kardiovaskulären System (Franco et al. 2014), dem Magen-Darm-Trakt (Burn und Hill 2009) und dem zentralen Nervensystem auf (Roussigné et al. 2012; Aizawa 2013). Bei normaler Lage der Organe spricht man von einem Situs solitus. Die Mechanismen, die zu den Asymmetrien im üblichen Situs führen, sind sehr robust. Fehler in diesen Mechanismen treten zwar auf, sind aber vergleichsweise selten. Kommt er zu einer komplett spiegelbildlichen Entwicklung spricht man von einem Situs inversus totalis. Dieser tritt bei Menschen in etwa einer von 10.000 Lebendgeburten auf (Lin et al. 2014). Ein solcher Zustand ist mit dem Leben meist gut vereinbar (Sutherland und Ware 2009). Kommt es bei einer Mutation in einem Signalweg der Rechts-Links-Differenzierung zu einem etwa gleich häufigen Auftreten des Situs solitus und des Situs inversus, spricht man von einer Randomisierung. Eine isolierte Störung der Lateralisierung einzelner oder weniger Organe, wobei alle anderen Organe regelrecht liegen, wird Heterotaxie genannt. Diese Fehlbildungen gehen im Gegensatz zum Situs inversus totalis häufig mit schwerwiegenderen gesundheitlichen Problemen einher (Bowers et al. 1996; Peeters und Devriendt 2006; Shiraishi und Ichikawa 2012). Als weitere Defekte in der Rechts-Links-Differenzierung von inneren Organen werden Isomerien angesehen. Bei solchen Störungen werden zwei morphologisch gleiche Seiten bei im Normalfall asymmetrischen Organen angelegt. Auf das Herz bezogen finden sich in einem solchen Fall beispielsweise zwei morphologisch linke Vorhofohren (Tynan et al. 1979). In Bezug auf den Oberbauchsitus gehen solche Fehlbildungen beispielsweise häufig mit einem Fehlen der Milz - bei einer Rechts-Isomerie - oder der Anlage multipler Milzen einher - bei einer Links-Isomerie (Raman et al. 2003). Solche Fehlbildungen entstehen bereits sehr früh während der

Embryonalentwicklung, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Rechts-Links-Symmetriebrechung in der embryonalen Frühentwicklung stattfindet (Blum et al. 2014a).

Für die Etablierung der späteren morphologischen Asymmetrie werden drei Phasen angenommen (Levin und Palmer 2007; Tabin 2011). Zunächst wird die Symmetrie anhand der Orientierung an den beiden bereits etablierten - dorsoventralen und kraniokaudalen -Körperachsen gebrochen. Die so generierten Rechts-Links-Unterschiede werden als nächstes auf molekularer Ebene durch seitenspezifische Genexpression fixiert. Schließlich führt die differentielle Genexpression zur Ausbildung der morphologischen Rechts-Links-Unterschiede. Als Zeitpunkt der Symmetriebrechung auf molekularer Ebene, die bei der überwiegenden Anzahl der Spezies der Symmetriebrechung auf morphologischer Ebene vorausgeht, werden die Gastrulations- und Neurulationsstadien der Embryonen angenommen (Blum et al. 2014a). Als früheste grobe morphologische Asymmetrie wird in den meisten Spezies der asymmetrisch werdende Herzschlauch angesehen, der wenig später die Herzschleife bildet. Diese verlagert sich im Regelfall zur rechten Körperseite (Stalsberg 1969). Als molekularer Signalweg der Symmetriebrechung wurde in allen bisher untersuchten Wirbeltierspezies der Nodal-Signalweg im linken Seitenplattenmesoderm identifiziert (Nakamura und Hamada 2012). Teile dieses Signalweges sind Nodal selbst und sein Inhibitor Lefty, das auch als Antivin bezeichnet wird (Chen und Shen 2004; Li et al. 2017). Bei beiden handelt es sich um sekretierte Proteine, die zur transforming growth factor TGF-B-Superfamilie gezählt werden (Zhou et al. 1993; Meno et al. 1996; Thisse und Thisse 1999). Nodal kann sowohl seine eigene Expression (Saijoh et al. 2005) als auch die von Lefty induzieren (Marjoram und Wright 2011). Schlussendlich führt die Nodal-Signalkaskade im linken Seitenplattenmesoderm zur frühen Expression des Homöobox-Transkriptionsfaktors Pitx2 (Shiratori et al. 2001). Pitx2 wird deutlich länger im Seitenplattenmesoderm exprimiert als Nodal (Ryan et al. 1998; Shiratori et al. 2001). Die molekulare Asymmetrie der Pitx2-Expression wird für die asymmetrische Morphogenese der Organe verantwortlich gemacht. Eine künstlich erzeugte zusätzliche Expression von Pitx2 im rechten Seitenplattenmesoderm führt in Hühnerembryonen zu einem Linksisomerismus des Herzens (Logan et al. 1998; Franco et al. 2017). Eine Mutation, die ein Ausbleiben der Pitx2-Expression während der Entwicklung von Mausembryonen verursacht, führt hingegen zum Rechts-Isomerismus der Lunge (Lin et al. 1999). Außerdem reguliert Pitx2 die asymmetrische Morphogenese der Blutgefäße (Shiratori et al. 2006). Bei der asymmetrischen Morphogenese des Darmrohrs induziert Pitx2 einseitig extrazelluläre Matrixproteine, sodass der Transkriptionsfaktor auch hier eine Rolle bei der Rechts-Links-Symmetriebrechung spielt (Davis et al. 2008; Kurpios et al. 2008). Interessanterweise sind Nodal und Pitx2 auch bei der Bildung der kraniokaudalen Achse in Kaninchenembryonen beteiligt. Sie werden hier zunächst gemeinsam an der Stelle exprimiert, an der der Primitivstreifen am posterioren Pol der Keimscheibe entsteht (Plöger und Viebahn 2018).

Die Nodal-Signalkaskade ist in allen bisher untersuchten Spezies innerhalb der Deuterostomia an der Rechts-Links-Differenzierung beteiligt (Chea et al. 2005). So wurden

alle drei Komponenten der Signalkaskade Nodal, Lefty und Pitx2 auch in Seeigelembryonen in einem asymmetrisch Expressionsmuster identifiziert – hier jedoch auf der definitionsgemäß rechten Seite des Embryos (Duboc et al. 2005; Molina et al. 2013). Darüber hinaus wurde der Nodal-Signalweg auch in einigen Protostomia gefunden. In Spezies aus dieser Gruppe ist er ebenfalls in der Rechts-Links-Symmetriebrechung direkt involviert. So spielt die *Nodal*-Expression in gehäusetragenden Schnecken eine Rolle für die Richtung, in die sich ihr Schneckenhaus spiralig windet. Dies ist ein weit bekanntes Beispiel für asymmetrische Morphologie bei Invertebraten (Grande und Patel 2009). Darüber hinaus wurde die gesamte Nodal-Signalkaskade inklusive Pitx2 in sehr vielen verschiedenen phylogenetischen Gruppen innerhalb der Bilateria identifiziert (Grande et al. 2015). In den häufig für embryologische Fragestellungen genutzten Modellorganismen *Caenorbabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* wurden hingegen bislang keine *Nodal*- oder *Nodal*-ähnlichen Gene gefunden, obwohl auch in diesen Spezies morphologische und funktionelle Asymmetrien entlang der Rechts-Links-Körperachse beschrieben wurden (Blum et al. 2014b).

Wie die asymmetrische Expression des Gens Nodal in den verschiedenen Spezies aber überhaupt etabliert wird, ist bisher nicht abschließend geklärt. Es scheint verschiedene Mechanismen zu geben, die in unterschiedlichen Tiergruppen genutzt werden (Tabin 2006). Bisher wurden zur initialen Brechung der molekularen Symmetrie in Wirbeltierembryonen zwei Hypothesen zu Mechanismen entwickelt (Blum et al. 2014a): die Zilienstrom-Hypothese (s. 1.3.1) und die Ionenfluss-Hypothese (s. 1.3.2). Zu beiden Hypothesen gibt es zahlreiche Hinweise, dass die vermuteten Mechanismen in verschiedenen Spezies eine entscheidende Rolle bei der Rechts-Links-Differenzierung spielen. Beiden Hypothesen ist gemein, dass sie vom Vorhandensein eines intrinsisch chiralen Moleküls ausgehen, das als "F-Molekül" bezeichnet wird (Brown und Wolpert 1990). Ein solches Molekül ist auch bei seiner vollkommen symmetrischen Verteilung im Embryo in der Lage, eine Asymmetrie zu generieren. Dazu wird dieses Molekül entlang der beiden bereits gebildeten dorsoventralen und kraniokaudalen Körperachsen ausgerichtet (Danilchik et al. 2006; Aw et al. 2008). Am ehesten kommen hierfür Zytoskelettbestandteile wie fibrilläre Moleküle oder Zentriolen als Mikrotubuli-organisierende Zentren in Betracht (Blum et al. 2014a). In den nächsten beiden Unterkapiteln werden die Zilienstrom- und die Ionenfluss-Hypothese in ihren bisher bekannten Einzelheiten beschrieben.

1.3.1 Die Zilienstrom-Hypothese

Ein gut untersuchter Mechanismus zur molekularen Rechts-Links-Symmetriebrechung wird unter der Zilienstrom-Hypothese zusammengefasst. Dabei wird vom Vorhandensein einzelner beweglicher (motiler) Monozilien auf den Zellen des Rechts-Links-Organisators ausgegangen. Diese Zilien zeigen in ihrer Innenarchitektur ultrastrukturell eine 9x2+0-Struktur und werden somit den primären Zilien zugeordnet (Kathem et al. 2014). Zilientragende Organisatorgewebe wurden in einigen verschiedenen Wirbeltierspezies gefunden (Blum et al. 2014b). Die Bildung motiler Zilien wird vor allem durch den Transkriptionsfaktor Foxj1 gesteuert (Blatt et al. 1999). Dieser führt unter anderem zur Bildung von sogenannten axonemalen Proteinen, die letztendlich die Zilien aufbauen (Choksi et al. 2014). Zu diesen Proteinen gehören auch Proteine, die als Rechts-Links-Dyneine bezeichnet werden, da sie an der Rechts-Links-Differenzierung von verschiedenen Spezies beteiligt sind (Sauer und Klar 2012). Eine Mutation des *Foxj1*-Gens führt in Mausembryonen zu einem Ausbleiben der Ausbildung von Zilien auf den Zellen des Rechts-Links-Organisators (Stauber et al. 2017). Darüber hinaus wird in diesen Mäusen eine Randomisierung des Situs beobachtet (Chen et al. 1998; Brody et al. 2000).

Zu den Organismen, in denen ein zilienbasierter Mechanismus der Symmetriebrechung beschrieben ist, gehören Fische, Amphibien und einige Säugetiere. Im Zebrafisch Danio rerio stellt das Kupffer-Vesikel dieses zilientragende Gewebe dar, dessen normale Funktion essentiell für die asymmetrische Genese von Herz, Hirn und Darm ist (Essner et al. 2005). Auch im Killifisch Fundulus heterolyticus wurde ein solches Kupffer-Vesikel identifiziert, das zilientragende Zellen enthält (Brummett und Dumont 1978). Im afrikanischen Krallenfrosch Xenopus laevis finden sich Zilien auf den Zellen des Urdarmdachs, der gastrocoel roof plate. Diese mesodermale Struktur geht aus dem oberflächlichen Mesoderm durch Involution an der dorsalen Urmundlippe hervor und bildet die dorsale Begrenzung des Gastrozöls, das auch als Urdarm oder Archenteron bezeichnet wird. Hier liegen Zellen des Mesoderm mit ihrer Oberfläche frei zur embryonalen Körperhöhle hin. Sie werden erst sekundär von endodermalen Zellen überwachsen (Shook et al. 2004). Eine Störung der Zilienfunktion in dieser Struktur führt zu Heterotaxien (Vick et al. 2009; Walentek et al. 2012). Auch in einigen Säugetieren wie bei Mäusen und Kaninchen wurde mit der Identifikation des ventralen Knotens zilientragendes Gewebe gefunden (Sulik et al. 1994; Essner et al. 2002; Okada et al. 2005; Blum et al. 2007), das bei Störungen zumindest in der Maus zu Rechts-Links-Defekten führt. Auch in Seeigelembryonen wurden Zilien auf mesodermalen Zellen identifiziert, die die asymmetrische Nodal-Expression induzieren. In motilen Zilien kommen Motorproteine vor, die zur Gruppe der Dyneine gezählt und hier als axonemale Dyneine bezeichnet werden. Sie bewirken den gerichteten Schlag der Zilien (Roberts et al. 2013). Diejenigen Dyneine, die in den Zilien der Rechts-Links-Organisatoren der verschiedenen Spezies vorkommen, werden Rechts-Links-Dyneine genannt (Essner et al. 2002).

Die Zilien werden entlang der kraniokaudalen Körperachse über den *planar cell polarity*-Signalweg am posterioren Pol der einzelnen Zellen positioniert (Antic et al. 2010; Song et al. 2010; Wallingford 2010). Dass es zu einer solchen polaren Verteilung der Zilien kommt, wurde unter anderem bereits in Seeigelembryonen beschrieben (Boskovski et al. 2013). Zusätzlich wird anhand der bereits etablierten Körperachsen die Zilienbewegung ausgerichtet, die hier eher einer Rotation entspricht als dem Zilienschlag der respiratorischen Epithelien (Hashimoto et al. 2010). Durch ihre Positionierung und die gerichtete Rotation wird ein Flüssigkeitsstrom der extrazellulären Flüssigkeit erzeugt, der zur linken Seite gerichtet ist (Nonaka et al. 1998; Kramer-Zucker et al. 2005). Eine Umkehr des Flüssigkeitsstroms in der Maus führt zur Umkehrung des Organsitus (Nonaka et al. 2002). In einer Studie wurde gezeigt, dass zwei rotierende Zilien auf dem ventralen Knoten der Maus ausreichen, um die Symmetrie zu brechen (Shinohara et al. 2012).

Zu der Frage, wie der gerichtete Flüssigkeitsstrom zur einseitigen Expression von Nodal führt, wurden wiederum verschiedene Theorien entwickelt. Einerseits könnten mit der Flüssigkeit Morphogene wie sonic hedgehog entweder als gelöste Moleküle oder aber gebunden an sogenannte node vesicular parcels zu einer Seite transportiert werden. Dort werden Signalkaskaden aktiviert, die zur einseitigen Expression von Nodal führen (Tanaka et al. 2005). Eine andere Theorie besagt, dass es zur mechanischen Wahrnehmung des Flüssigkeitsstroms kommt. Hierfür gibt es neben den motilen Zilien eine zweite Population sensorischer Zilien im ventralen Knoten der Mausembryonen (Tabin und Vogan 2003). Diese Zilien sind unbeweglich und tragen keine axonemalen Dyneine. Die Auslenkung solcher Zilien aktiviert eine Signalkaskade, die auf dem Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum basiert (Norris 2012). Auf diesen Zilien befindet sich hierfür der mechanosensitive Kalziumkanal PKD-2 (González-Perrett et al. 2001). Eine Mutation dieses Rezeptors in Mäusen führt zur bilateralen Expression von Pitx2 und so zu Isomerien (McGrath et al. 2003). In Xenopus wurde gezeigt, dass die Expression des Gens Coco als physiologischem Nodal-Inhibitor als Resultat des gerichteten Flüssigkeitsstroms im linken Seitenplatten-mesoderm herunterreguliert wird und so die verstärkte Expression des Gens Nodal auf dieser Seite ermöglicht (Schweickert et al. 2010).

Da der Flüssigkeitsstrom extrazellulär stattfindet, wird der zilienbasierte Mechanismus auch als extrazelluläres Modell bezeichnet (Vandenberg und Levin 2010). Dabei tritt der Flüssigkeitsstrom in fortgeschrittenen Gastrulationsstadien der Embryonen auf – in *Xenopus* in den Stadien 15 bis 19 nach Faber und Nieuwkoop (Faber und Nieuwkoop 1994). Daher wird in diesem Zusammenhang auch von einer späten Symmetriebrechung gesprochen (Vandenberg und Levin 2013).

Erkrankungen, bei denen Zilien in ihrer Struktur und Funktion geschädigt sind, werden als Ziliopathien bezeichnet. Dazu zählen auch die primären ziliären Dyskinesien, die beim Menschen als syndromale Erkrankungen vorkommen. Gehen diese mit einem *Situs inversus totalis* einher, spricht man vom Kartagener-Sydrom. Betroffene leiden oft unter chronischen Sinusitiden und Infertilität. Diese Gruppe von Erkrankungen konnte unter anderem mit Defekten in Dyneinstrukturen in Zilien assoziiert werden (Afzelius 1976; Zariwala et al. 2007; Leigh et al. 2009). Die zugrunde liegenden Mutationen kommen unter anderem in den *Dynein*-Genen vor und führen zur Immobilität der sonst beweglichen Zilien.

Zusammengefasst geht man gemäß der Zilienstrom-Hypothese vom Vorkommen motiler Zilien auf den Zellen des Rechts-Links-Organisators aus. Diese führen durch Rotationsbewegungen zu einem immer gleichsinnig gerichteten extrazellulären Flüssigkeitsstrom, der wiederum einseitig die Expression den Gens *Nodal* induziert. Hinweise, die auf die Gültigkeit der Zilienstrom-Hypothese zur Rechts-Links-Symmetriebrechung hindeuten, stammen aus Fischen, Fröschen und Mäusen.

1.3.2 Die Ionenfluss-Hypothese

Alternativ zur Hypothese der Symmetriebrechung durch bewegliche Zilien wurde die Ionenfluss-Hypothese formuliert. Die einzelnen Aspekte dieser Theorie wurden bisher hauptsächlich an Xenopus- und Hühnerembryonen untersucht. Demnach sollen die F-Moleküle anhand der Orientierung an der dorsoventralen und der kraniokaudalen Achse bereits während der ersten Furchungsteilungen ausgerichtet werden (Danilchik et al. 2006). Entlang dieser bisher nicht identifizierten F-Moleküle werden dann mRNA-Moleküle oder Proteine wie Protonenpumpen und Kaliumkanäle gerichtet an eine Seite des Embryos transportiert (Qiu et al. 2005). Dabei handelt es sich in diesen Entwicklungsstadien noch um maternale RNA-Moleküle. Gezeigt wurde ein solcher Mechanismus der Verteilung maternaler RNA zur Etablierung einer Körperachse erstmalig bei Drosophila-Embryonen (Nüsslein-Volhard 1977). Die Aktivität der asymmetrisch verteilten Ionenpumpen und kanäle führt zu pH- und Depolarisationsgradienten (Levin et al. 2002; Adams et al. 2006; Morokuma et al. 2008). Entlang solcher Gradienten werden kleine geladene Moleküle gerichtet auf eine Seite des Embryos transportiert. Der interzelluläre Transport geschieht dabei am ehesten über gap junctions (Levin und Mercola 1999; Fukumoto et al. 2005a; Fukumoto et al. 2005b). Der Öffnungszustand dieser Zell-Zell-Verbindungen ist unter anderem vom pH-Wert der Umgebung abhängig. In Xenopus wurde gezeigt, dass in den Stadien der Furchungsteilungen der Transport von intrazellulären Molekülen über Zellgrenzen hinweg gerichtet stattfinden kann. Manche Zellen können Moleküle an andere abgeben, nehmen selbst aber keine auf (Guthrie et al. 1988). Der gerichtete Transport kann außerdem durch einen Isolator in eine Richtung verhindert werden (Blum et al. 2014a). Eine Mutation im humanen Connexin43-Gen beispielsweise, das vor allem an der Bildung der kardialen gap junctions beteiligt ist, führt beim Menschen zu Heterotaxien und Isomerien (Britz-Cunningham et al. 1995). Als entlang des Spannungsgradienten über gap junctions verteiltes Molekül kommt am ehesten das biogene Amin Serotonin in Betracht. In Xenopus kann Serotonin über epigenetische Modifikationen die Expression von Nodal (bzw. dessen Xenopus-Homolog) auf der rechten Körperseite unterdrücken (Carneiro et al. 2011). Dies könnte also zu einer Nodal-Expression im linken Seitenplattenmesoderm führen.

Als asymmetrisch verteilte oder agierende Ionenpumpe wurde in *Xenopus* und Huhn die H⁺/K⁺-ATPase ATP4 beschrieben (Levin et al. 2002). In den adulten Organismen ist diese wie auch beim Menschen für die Produktion der Magensäure verantwortlich. Im mehrteiligen Magen der Hühner ist sie vor allem im sogenannten Drüsenmagen, *Proventrikulus*, aber nicht im Muskelmagen, *Ventrikulus*, vorhanden (Scanes 2014). Außerdem wird sie in den Nieren von Kaninchen, Mäusen und Ratten exprimiert, wo sie an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts mitwirkt (Wingo 1989; Gumz et al. 2009). Im Magen kommt sie insbesondere an den Parietalzellen der Mukosa vor (Sachs et al. 1976). Eine Mutation der ATP4 führt in Mäusen zum Fehlen der Magensäure – einer sogenannten Achlorhydrie – und einer konsekutiven Eisenmangelanämie (Spicer et al. 2000; Krieg et al. 2011). Unter Spaltung von ATP transportiert diese Ionenpumpe ein Proton H⁺ aus der Zelle heraus. Dafür wird ein

Kaliumion K⁺ aufgenommen. Dieses kann über Kaliumkanäle die Zelle wieder verlassen. Die Kaliumkanäle, die diese Rezirkulation hauptsächlich ermöglichen, sind KCNQ1-KCNE2 und Kir4.1 (Fujita et al. 2002; Lambrecht et al. 2005). Die ATPase besteht aus zwei Untereinheiten – α und β . Die α -Untereinheit – ATP4a – ist die katalytisch aktive Einheit. Sie besteht in verschiedenen Säuger-Spezies aus 1.033 oder 1.034 Aminosäuren, die in ihrer Sequenz zu 98% homolog sind (Shull und Lingrel 1986; Maeda et al. 1988; Shin et al. 2009). Zur weit verbreiteten Na⁺/K⁺-ATPase ATP1 ist die ATP4 zu etwa 63% homolog (Maeda et al. 1990). Die β -Untereinheit – ATP4b – spielt vor allem eine Rolle bei dem korrekten Transport der heterodimeren Ionenpumpe an die apikale Zellmembran der Parietalzellen des Magens und bei der Stabilisierung der Ionenpumpe (Beggah et al. 1999; Vagin et al. 2004; Vagin et al. 2005). In Embryonen wurde die ATP4 ebenfalls nachgewiesen. In *Xenopus* wurde mittels *In-situ*-Hybridisierung bereits im Zweizellstadium eine asymmetrische Verteilung der maternalen ATP4a-mRNA beschrieben (Levin et al. 2002).

Da sich alle Prozesse, die unter der Ionenfluss-Hypothese zusammengefasst werden, intrazellulär abspielen, spricht man in diesem Zusammenhang vom intrazellulären Modell zur Rechts-Links-Symmetriebrechung (Vandenberg und Levin 2013). Außerdem finden diese Prozesse sehr früh während der Entwicklung statt, sodass dieses Modell auch als frühes Modell zur Rechts-Links-Symmetriebrechung bezeichnet wird (Vandenberg und Levin 2010).

Pharmakologische Inhibitoren der H⁺/K⁺-ATPase des Magens sind aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Sie sind heutzutage als "Säureblocker" die erste Wahl zur medikamentösen Behandlung von Magengeschwüren und der gastroösophagealen Refluxkrankheit (Herold 2015). Es handelt sich bei diesen Protonenpumpeninhibitoren um Wirkstoffe wie Omeprazol oder Pantoprazol. Chemisch betrachtet gehören diese Substanzen zu den Benzimidazolen (Fellenius et al. 1981; Wallmark et al. 1983). Ein weiterer - klinisch aufgrund von Leberwerterhöhungen nicht angewendeter Protonenpumpeninhibitor (Sugano 2018) - ist das Imidazopyridin 2-Methyl-8-[Phenylmethoxy] Imidazo-(1,2a) Pyridin 3-Acetonitril - oder kurz SCH28080 (Keeling et al. 1988). Anders als die Benzimidazole wirkt SCH28080 unabhängig vom umgebenden pH-Wert auf die Protonenpumpe inhibitorisch (Lorentzon et al. 1987; Sachs et al. 2007). Solche Protonenpumpeninhibitoren wurden neben vielen weiteren Substanzen in einer großen Versuchsreihe an Xenopus-Embryonen bei der Suche nach Pharmaka eingesetzt, die zu Defekten der Lateralisierung führen. Dabei haben Embryonen, die mit den Wirkstoffen Lansoprazol, Omeprazol und SCH28080 behandelt wurden, Heterotaxien des Herzens, der Gallenblase und des Magens gezeigt (Levin et al. 2002). In der zu den Chordaten gehörenden Seescheide Ciona intestinalis führt die Behandlung mit Omeprazol zu einer beidseitigen Expression von Pitx2 (Shimeld und Levin 2006). In Seeigeln führt eine Behandlung mit Omeprazol zu einer Randomisierung der Nodal-Expression (Bessodes et al. 2012). Unter den Wirbeltieren konnte ein Effekt der Behandlung sowohl für Omeprazol als auch für SCH28080 in Zebrafischembryonen gezeigt werden. Die Behandlung führte zu einer umgekehrten Herzschleifenbildung und zu einer rechtsseitigen Expression von *Pitx2* in fast der Hälfte der behandelten Embryonen (Kawakami et al. 2005).

Zusammenfassend geht man bei der Ionenfluss-Hypothese von einer frühen asymmetrischen Verteilung der Ionenpumpe ATP4 aus. Diese führt über Membrandepolarisationsgradienten zu einer asymmetrischen Verteilung kleiner, geladener Moleküle, die am ehesten über epigenetische Faktoren zur einseitigen Expression von *Nodal* führen. Hinweise für die Ionenfluss-Hypothese stammen bisher vor allem aus *Xenopus*.

1.4 Symmetriebrechung in Hühnerembryonen

Auch in Hühnerembryonen wird Nodal in den frühen Somitenstadien im linken Seiteplattenmesoderm exprimiert (Levin et al. 1995). Allerdings stellen Hühnerembryonen bezüglich ihrer Mechanismen zur Symmetriebrechung eine Ausnahme dar (Blum et al. 2014b). So wurde ein Äquivalent zu den Zilien-tragenden Regionen anderer Organismen wie dem ventralen Knoten der Maus, der gastrocoel roof plate von Xenopus oder dem Kupffer-Vesikel des Zebrafischs vergeblich gesucht. Zwar wurden Zilien in der Region des Hensen-Knotens des Huhn beschrieben (Essner et al. 2002), allerdings sind diese auf dem Endoderm lokalisiert (Gros et al. 2009). Die Zilien, die für die Rechts-Links-Symmetriebrechung in der Maus, in Xenopus und im Zebrafisch verantwortlich gemacht werden, sind auf mesodermalen Zellen lokalisiert. Die im Huhn gefundenen Zilien befinden sich dagegen auf sehr breiten flachen Zellen und sind zudem sehr kurz. Daher wird davon ausgegangen, dass diese nicht für die Etablierung eines gerichteten Flüssigkeitsstroms ausreichen (Männer 2001). Die Chorda dorsalis und der Hensen-Knoten des Huhns sind ventral vollständig von Endoderm bedeckt. Die Chorda dorsalis wird anders als in der Maus nicht in das Endoderm integriert. Dadurch gibt es keinen Raum für einen extrazellulären Flüssigkeitsstrom. Zudem wurden keine motilen Zilien an der entscheidenden Stelle nachgewiesen (Männer 2001). Zwischen der Chorda dorsalis und dem Hypoblast liegt zusätzlich mit dem subchordalen Mesoderm eine weitere Zellschicht, die einen gerichteten Flüssigkeitsstrom verhindert (Tsikolia et al. 2012; Otto et al. 2014; Schröder 2017). In Talpid-Hühnern (Davey et al. 2006), die aufgrund einer Mutation keine primären Zilien bilden, wurden darüber hinaus keine Rechts-Links-Defekte beschrieben (Stephen et al. 2014). Ein Knockout des Talpid-Gens in der Maus führt hingegen zur Ausbildung von Rechts-Links-Defekten (Bangs et al. 2011).

Eine weitere Spezies, in deren Embryonen bisher keine Zilien im Rechts-Links-Organisator nachgewiesen wurden, ist das Schwein. Auch hier wird die *Chorda dorsalis* nicht in das Endoderm integriert, sodass sie ventral vollständig von dieser Zellschicht bedeckt bleibt (Gros et al. 2009).

Im Gegensatz zu Embryonen vieler anderer Organismen zeigt der Hensen-Knoten des Huhns bereits sehr früh kurz nach seiner Bildung eine asymmetrische Morphologie. Diese frühe morphologische Asymmetrie wurde auch in Embryonen des phylogenetisch älteren Emus beschrieben (Nagai et al. 2011). Daher wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei

1.4.1 Frühe morphologische Asymmetrien

Hühnerembryonen weisen bereits sehr früh eine morphologische Asymmetrie auf (Rabl 1897; Wetzel 1929; Dathe et al. 2002; Cooke 2004; Tsikolia et al. 2012). Anders als in den meisten untersuchten Wirbeltierembryonen ist es nicht das Herz, das die erste asymmetrische Morphologie ausweist, sondern der Hensen-Knoten selbst (s. 1.2). Diese Asymmetrie wird nach bisherigem Wissensstand noch vor der frühesten bekannten asymmetrischen Genexpression etabliert (Dathe et al. 2002; Tsikolia et al. 2012). Der Knoten des Huhns lässt sich in zwei Domänen unterteilen: die rechte und die linke Knotenschulter (s. 1.2). Die rechte Knotenschulter kann in (rasterelektronen-) mikroskopischen Aufnahmen an einer dorsalen Wölbung erkannt werden. Außerdem entstehen im Huhn weitere axiale Strukturen aus dem bereits asymmetrischen Knoten auf asymmetrische Art und Weise. Die *Chorda dorsalis* geht aus der rechten Knotenschulter hervor, während die linke Knotenschulter die zukünftige Bodenplatte des Neuralrohrs bildet (Otto et al. 2014; Kremnyov et al. 2018).

Die morphologische Asymmetrie des Knotens kann nicht nur in Übersichtsaufnahmen der Embryonen gefunden werden (Abb. 1), sondern auch in histologischen Schnitten (Dathe et al. 2002; Tsikolia et al. 2012; Otto et al. 2014). Ab Stadium HH 5- wird die rechte Kotenschulter bei transversaler Schnittführung in weiter anterior liegenden Schnitten sichtbar. Der Anschnitt der linken Knotenschulter beginnt erst weiter posterior. Die rechte Schulter wölbt sich nach dorsal und zeigt eine größere dorsoventrale Ausdehnung als die linke Schulter. In schrägen Semidünnschnitten von Hühnerembryonen aus dem Knotenbereich wurden Knotenabschnitte miteinander verglichen, die in Stadium HH 4+ noch nebeneinander lagen (Carpaij 2014). Die weiter anterior liegende rechte Knotenschulter zeigt in dieser Schnittführung eine deutliche dorsale Wölbung, die auf der linken Seite vollständig fehlt (Abb. 2C/D). Diese Vorwölbung des Ektoderm kommt am ehesten durch eine Verdickung des darunter liegenden Mesoderm zustande. Hier wächst axiales Mesoderm aus, das seinen Ursprung in der rechten Knotenschulter nimmt. Die linke Knotenschulter bleibt an der Oberfläche und die Zellen werden zur zukünftigen Bodenplatte des Neuralrohrs (Otto et al. 2014). Unter der linken Knotenschulter ist das Mesoderm in seiner dorsoventralen Ausdehnung dünner als auf der rechten Seite. (Abb. 2).

In den Semidünnschnitten fallen besondere extrazelluläre Räume im Knotenbereich und im knotennahen auswachsenden axialen Mesoderm auf. Diese Räume enthalten eine Matrix, die weniger stark gefärbt ist als die umgebenden zellulären Bestandteile. Sie wurden bisher als intraepitheliale Räume gedeutet und entsprechend als *intraepithelial spaces* bezeichnet (Carpaij 2014).



Abb. 2: Knotenasymmetrie in Semidünnschnitten. Semidünnschnitte eines Embryos in Stadium HH 5 in schräger Schnittführung. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 μm an. Die gekreuzten Pfeile geben die Orientierung im Embryo an: d: dorsal, v: ventral, l: links, r: rechts (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

1.4.2 Frühe molekulare Asymmetrien

Wie in vielen bisher untersuchten Spezies innerhalb der Bilateria, ist auch in Hühnerembryonen *Nodal* asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm exprimiert. Allerdings gibt es anders als in den meistens anderen Spezies auch früher während der Entwicklung bereits molekulare Unterschiede entlang der Rechts-Links-Körperachse. So wird *Nodal* selbst bereits in Stadium HH 5 in einem Bereich neben dem Hensen-Knoten, einer paranodalen Domäne, asymmetrisch exprimiert (Tsikolia et al. 2012). Außerdem wurden bereits ab Stadium HH 4+ bei der Untersuchung der Gene *FGF8* und *shh* asymmetrische Expressionsmuster gefunden. FGF8 ist im Primitivstreifen exprimiert, wobei die Expression auf der rechten Seite bis weiter nach vorne reicht (Levin et al. 2002). *shh* wird in der Mittellinie anterior des Knotens und in der linken Knotenschulter exprimiert (Levin et al. 2014).

Die molekularen Bestandteile, auf denen die Zilienstrom-Hypothese zur Rechts-Links-Symmetriebrechung beruht, sind in Hühnerembryonen bisher lediglich unvollständig untersucht worden. Bislang wurde die Expression eines *Rechts-Links-Dyneins* im Huhn beschrieben (Essner et al. 2002). Die Expression des Mastergens für motile Zilien *Foxj1*, das in *Xenopus* und Maus die Expression des *Rechts-Links-Dyneins* induziert (Stubbs et al. 2008), wurde in Hühnerembryonen bisher nicht untersucht (Blum et al. 2014b). Eine Mutation in beiden Genen führt in der Maus und in *Xenopus* zu Defekten bei der Rechts-Links-Differenzierung (Supp et al. 1997; Zhang et al. 2004).

Bei einer Untersuchung zum ATP4-basierten Mechanismus (Ionenfluss-Hypothese, s. 1.3.2) der Rechts-Links-Symmetriebrechung im Huhn wurde vermeintlich die mRNA sowohl für die α- als auch für die β-Untereinheit der Protonenpumpe gefärbt. Dabei zeigte sich eine symmetrische Färbung im Primitivstreifen noch bevor die Bildung der Chorda dorsalis beginnt (Levin et al. 2002). Allerdings ist die angegebene Sequenz in der Originalarbeit eher einer Na+/K+-ATPase zuzuordnen als der H+/K+-ATPase ATP4. Es liegen also zur Expression der α-Untereinheit der ATP4 bisher keine Daten aus Hühnerembryonen vor. Die Expressionsdaten aus Xenopus wurden bereits reevaluiert und das gefundene asymmetrische Muster in den frühen Furchungsstadien konnte nicht bestätigt werden (Walentek et al. 2012). Die Unterdrückungsexperimente mit Protonenpumpeninhibitoren, die in Xenopus zu Heterotaxien geführt haben, führten bei etwa 14% der behandelten Hühnerembryonen zu einer Verlagerung der Herzschleife zur linken Seite. Bei diesen Experimenten wurden die Inhibitoren Omeprazol und SCH28080 entweder durch eine direkte Injektion in das Eiweiß, also in ovo, appliziert oder die Embryonen wurden in einer einfachen Filterkultur behandelt (Chapman et al. 2001). Bei diesen experimentellen Embryonen zeigte sich teilweise eine beidseitige Expression der Gene Nodal und Pitx2 im Seitenplattenmesoderm. Zudem wurden Färbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3) an Hühnerembryonen durchgeführt, mit denen die Depolarisation der Zellmembranen in Geweben visualisiert werden können. Hierbei zeigte sich ein asymmetrisches Depolarisationsmuster mit einer stärkeren Depolarisation links neben dem Hensen-Knoten in den Stadien HH 3 bis HH 4. Dieses Muster wurde auf die Aktivität der H+/K+-ATPase zurückgeführt, da sich nach der Applikation eines Protonenpumpeninhibitors ein symmetrisches Depolarisationsmuster zeigte (Levin et al. 2002).

1.4.3 Asymmetrische Zellbewegungen

In Hühnerembryonen wurde ein Prozess gefunden, der alternativ zur Zilienstrom- oder Ionenfluss-Hypothese als Grundlage für die Symmetriebrechung dienen könnte. Es wurden asymmetrische Zellbewegungen des Epiblast unmittelbar vor dem Hensen-Knoten nachgewiesen. Dabei wandern in Stadium HH 4 einige Zellen von der rechten auf die linke Seite über die Mittellinie hinweg (Gros et al. 2009). Als molekulare Grundlage für solche gerichteten Zellbewegungen kommen am ehesten Zell-Adhäsionsmoleküle in Betracht. Zunächst wurde N-Cadherin als mögliches beteiligtes Molekül angenommen. Dieses wird insbesondere in Geweben exprimiert, in denen Zellen voneinander separiert werden. Bei solchen Geweben handelt es sich unter anderem um den Primitivstreifen, das Neuroektoderm und die Linsenplakode (Hatta und Takeichi 1986). In Hühnerembryonen wurde die Expression des Gens N-Cadherin im Primitivstreifen gefunden (Garcia-Castro et al. 2000). Die Expression auf mRNA-Ebene ist ab Stadium HH 4+ als asymmetrisch auf der rechten Seite des Knotens beschrieben (Mendes et al. 2014). Eine Inhibition der durch N-Cadherin gebildeten Zell-Zell-Kontakte mit einem Antikörper gegen N-Cadherin resultiert bei Embryonen, die in Stadium HH 4 in New-Kultur (s. 2.1.2.2) behandelt wurden, zur Randomisierung des Herzschleifenbildung (García-Castro et al. 2000). Spätere Inhibitionsexperimente haben gezeigt, dass N-Cadherin nicht die gerichtete Bewegung initiiert. Eine Blockierung des N-Cadherins führt dazu, dass die Zellen länger um den Knoten herum wandern. Daher wird davon ausgegangen, dass N-Cadherin an der Beendigung der Zellbewegungen beteiligt ist (Mendes et al. 2014). Diese Zellbewegungen resultieren in der Drehung des Knotens zur linken Seite, die zu einer asymmetrischen Expression der Gene shh und Fibroblast growth factor 8 (FGF8) führt. FGF8 wurde als Molekül identifiziert, das Zellen nicht anzieht, sondern eher zurücktreibt. FGF4 hingegen wirkt auf Zellen anziehend (Yang et al. 2002). Embryonen, die mit Rho-Inhibitoren oder dem MyosinII-Inhibitor Blebbistatin zur Unterdrückung der Zellebewegungen behandelt wurden, zeigen eine eher symmetrische und nach anterior verlängerte Knotenmorphologie (Gros et al. 2009). Interessanterweise besteht eine Verbindung zwischen der Ionenfluss-Hypothese und N-Cadherin. In Embryonen, die in Stadium HH 4 mit Omeprazol behandelt wurden, wird N-Cadherin in Stadium HH 5 anders als in unbehandelten Embryonen symmetrisch exprimiert (Mendes et al. 2014).

In diesem Modell zur gerichteten Zellbewegung als Grundlage für die Symmetriebrechung bleibt allerdings unklar, wieso genau die Zellen ihre Migration gerichtet vollziehen. Auch dafür könnten F-Moleküle verantwortlich sein (Brown und Wolpert 1990). Eine weitere Quelle für die Richtungsinformation könnte das umliegende Gewebe um den Knoten darstellen. So führt eine autologe Transplantation des Knotens in umgedrehter Orientierung in Stadium HH 4 zur normalen Expression von *Nodal* auf der linken Seite. Das gleiche Experiment an Embryonen in den Stadium HH 5 und HH 5+ führt zur beidseitigen beziehungsweise rechtsseitigen Nodal-Expression (Pagán-Westphal und Tabin 1998).

Ein Mechanismus zu gerichteten Zellbewegungen wurde auch in *Drosophila*-Embryonen gefunden. Hier kommt es zur asymmetrischen Interkalation von Zellen, die zur asymmetrischen Morphogenese der Genitalorgane der Fliegen führen (Sato et al. 2015).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Der gegenwärtige Forschungsstand zur Rechts-Links-Differenzierung des Huhns bietet in den drei folgenden Feldern Untersuchungslücken oder Widersprüche, zu denen in der vorliegenden Arbeit klärende Befunde erhoben werden sollen:

1) Da beim Huhn nach rotationsfähigen Zilien bisher nur an den außen liegenden Zelloberflächen des frühen Embryos gesucht wurde, ist die Frage bisher unbeantwortet, ob an inneren Oberflächen wie beispielsweise den intraepithelialen Räumen Zilien vorkommen. Daher soll der Hensen-Knoten licht- und elektronenmikroskopisch untersucht werden. Weitere Hinweise auf das eventuelle Vorkommen motiler Zilien sollen durch die Expressionsanalyse von *Foxj1* und *Rechts-Links-Dynein* gesammelt werden.

2) Da die ATPase-abhängige Ionenfluss-Hypothese durch erneute Expressionsanalyse der ATP4 in *Xenopus* und dem dabei gefundenen symmetrischen Expressionsmuster infrage gestellt wurde und außerdem bei der Expressionsanalyse im Huhn eine Sonde für eine Na⁺/K⁺-ATPase verwendet wurde, soll hier eine Sonde für die H+/K+-ATPase hergestellt und die Expression im Huhn neu untersucht werden. Außerdem sollen die Membrandepolarisationsmuster überprüft werden. Schließlich soll auch die *Nodal*-Expression nach pharmakologischer ATP4-Unterdrückung in kultivierten Embryonen reevaluiert werden.

3) Da in *Xenopus* die Foxj1-gesteuerte Zilienbildung vom Ionentransporter ATP4 abhängig sein soll und an diesem Regulationsmechanismus auch der Wnt-Signalweg beteiligt sein soll, soll – unter der Annahme, dass Foxj1 beim Huhn eine verkappte Zilienbildung antreibt – die *Foxj1*-Expression nach pharmakologischer Unterdrückung der ATP4 untersucht werden. Außerdem soll die *Nodal*-Expression nach Unterdrückung des Wnt-Signalwegs untersucht werden.

2 Methoden

Alle Laborarbeiten wurden in der Abteilung Anatomie und Embryologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Da im Rahmen dieser Arbeit nicht mit humanem Material gearbeitet wurde, war kein Ethikvotum der Ethikkommission nötig. Ein entsprechender Bescheid ist unter der Antragsnummer DOC_216_2015 zu finden. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit keine genehmigungspflichtigen Tierversuche durchgeführt, sodass kein Tierversuchsantrag gestellt wurde. Die Arbeit mit den gentechnisch veränderten Organismen erfolgte nach den Bestimmungen des Gentechnikgesetzes (GenTG vom 20.06.1990) unter S1-Bedingungen.

Listen der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien befinden sich im Anhang (s. 6.1).

2.1 Embryologische Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Eier der Haushuhnrassen (*Gallus gallus domesticus*) White leghorn und Vorwerk verwendet. Außerdem wurden Eier transgener Hühner, deren Zellmembranen durch Insertion des *green fluorescent protein* (GFP)-Gens grün fluoreszieren (Rozbicki et al. 2015), aus Großbritannien (Roslin institute, Prof. Helen Sang) für die *Live-imaging*-Untersuchungen importiert. Die Inkubation der Eier bis zum benötigten Entwicklungsstadium erfolgte entsprechend der benötigten Entwicklungsstadien für 8 – 24 h (für die Stadien 3 bis 5) oder für 7 Tage (Stadium 32) in einem handelsüblichen Inkubator (Modell 400, Brutmaschinen-Janeschitz, Hammelburg) bei 38°C in feuchter Atmosphäre. Die grobe Stadienbestimmung der Embryonen erfolgte nach Hamburger und Hamilton (1951), eine genauere Einteilung wurde gemäß Selleck und Stern (1991) und Tsikolia et al. (2012) vorgenommen. Die Bestimmung des Entwicklungsstadiums erfolgte vor allem anhand von morphologischen Gesichtspunkten (s. 1.2).

2.1.1 Explantation von Hühnerembryonen

Zur Gewinnung von Hühnerembryonen, beispielsweise zur Expressionsanalyse verschiedener Gene, wurden die inkubierten Eier zunächst am stumpfen Ende mit einer Kanüle angestochen, sodass das Eigelb mit dem Embryo absank. Dadurch wurde eine Verletzung der Dottermembran beim anschließenden Eröffnen des Eis verhindert. Das Eiweiß wurde weitestgehend abgegossen und das Eigelb in eine Schale mit Locke'scher Lösung überführt. Der Dotter wurde so ausgerichtet, dass der Embryo oben zu liegen kam. Eiweißreste an der Dottermembran über dem Embryo wurden vorsichtig mit einer Spritze abgesaugt. Die Dottermembran wurde um den Embryo herum eingeschnitten, sodass dieser gemeinsam mit der Dottermembran mithilfe zweier feiner Pinzetten abgezogen werden konnte. Der Embryo wurde anschließend zusammen mit der Dottermembran umgedreht und mithilfe eines Uhrglases in eine Schale mit Locke'scher Lösung übertragen. Dort wurde

Dotterreste mit einer Pipette behutsam abgespült und die Keimscheibe von der Dottermembran gelöst. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit sterilem Glasgut, autoklavierten Lösungen und alkoholdesinfiziertem Besteck (Voiculescu et al. 2008; Sydow et al. 2017).

Locke'sche Lösung: 152,4483 mM NaCl 5,6406 mM KCl 2,1357 mM CaCl₂ in *Aqua bidest.*, autoklavieren

2.1.2 Kultivierung von Hühnerembryonen

Zur Beobachtung der Embryonen und zur Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen wurden diese in Kultur genommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Kulturmethoden verwendet. Zur pharmakologischen Inhibition der Embryonen und für die Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol (DiBAC4(3))-Experimente wurde eine Spannungsring-Methode (s. 2.1.2.1) verwendet. Zum *live-imaging* wurden New-Kulturen (s. 2.1.2.2) angelegt.

2.1.2.1 Spannungsring-Kultur

Für die Spannungsring-Kultur (Seidl 1977; Sydow et al. 2017) wurden die Eier zunächst ähnlich wie unter 2.1.1 beschrieben präpariert. Allerdings wurde vor dem Eröffnen des Eis mithilfe einer Spritze dünnflüssiges Eiweiß direkt aus dem Ei abgesaugt und aufbewahrt. Nach dem Überführen des Dotters in eine Schale mit Locke'scher Lösung wurden Eiweißreste sorgfältig mithilfe einer Spritze von der Dottermembran entfernt. Die Dottermembran wurde etwa auf Höhe des Dotteräquators zirkulär eingeschnitten, sodass ein möglichst großes Stück der Dottermembran, das den Embryo in seiner Mitte trägt, gewonnen werden konnte. Das Stück Dottermembran wurde umgedreht und mit wenig Flüssigkeit auf ein Uhrglas übertragen. Für die Kultur wurden Kulturschalen aus schwarz eloxiertem Aluminium mit einer mittigen, ebenen Erhebung von der Größe eines mittleren Durchmessers eines Eidotters verwendet. Die Kulturschale ist mit einer Bohrung versehen, die eine Verbindung zwischen der Erhebung und der Außenwand für die Applikation von Eiweiß schafft (Abb. 3). In diese Bohrung wurde die Spritze eingeführt und der Kanal vor dem Aufbringen des Embryos entlüftet. Zusätzlich wurde die Erhebung mit Eiweiß bedeckt. Die Spritze mit dem Eiweiß verblieb zunächst an der Kulturschale. Anschließend wurde die Dottermembran mit dem Embryo in ihrer Mitte und dessen Hypoblastseite nach oben von der Uhrglasschale auf die Erhebung übertragen. Danach wurde überschüssige Flüssigkeit von der Dottermembran und aus dem Randwall mit einer weiteren Spritze entfernt. Anschließend wurde die Dottermembran so über den Rand der Erhebung gezogen, dass der Embryo mittig zu liegen kam und mit einem passgenauen, den Rand der Erhebung knapp umfassenden Ring (Abb. 3B), fixiert. Durch den Eiweißkanal wurde daraufhin zwischen Erhebung und Dottermembran so viel Eiweiß gegeben, dass sich die Dottermembran unter leichter Spannung hochwölbte (Abb. 3C). Die seitliche Öffnung der Bohrung wurde nach

Entfernen der Spritze mit einem passgenauen Verschluss permanent verschlossen. Anschließend wurden unter Lupenvergrößerung vorsichtig Dotterreste mit Locke'scher Lösung von der Keimscheibe abgespült und das Stadium des Embryos bestimmt. Die Kulturschalen wurden in einer feuchten Kammer mit sterilem destilliertem Wasser zunächst bis zum Beginn der Experimente bei 38°C inkubiert.



Abb. 3: Kulturschale aus Aluminium mit Spannungsring. (A) Basis mit zentraler ebener Erhebung und exzentrischer waagerechter Öffnung des Eiweißkanals auf der Erhebung und senkrechter Öffnung an der Außenwand der Kulturschale. (B) Aluminium-Ring, der mit geringem Spiel über den Rand der Erhebung passt. (C) Kulturbereiter Embryo im Stadium HH 9 auf invertierter, mit dem Spannungsring fixierter Dottermembran unter optimaler Spannung und nach permanentem Verschluss der seitlichen Eiweißkanalöffnung (Abbildung verändert nach Sydow et al. 2017; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags).

Eine Abwandlung der Kulturschale mit einer großen zentralen Bohrung durch die Erhebung und anschließender Einpassung eines Deckglases zur Durchlichtmikroskopie wurde für Embryonen verwendet, die in der Kultur mikroskopiert werden sollten (Abb. 4).



Abb. 4: Durchlicht-Kulturschale. (A) Basis mit großer zentraler Bohrung im Podest mit eingeklebtem Deckglas. Der Eiweißkanal ist links sichtbar, die rechte Bohrung dient der Belüftung des Raums unter dem Deckglas. (B) Passgenauer Ring (verändert nach Sydow et al. 2017; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags).

2.1.2.2 New-Kultur

Die New-Kultur (New 1955) wurde für das *live-imaging* von Membran-GFP-transgenen Hühnern (Rozbicki et al. 2015) verwendet. Hierzu wurde nach der Gewinnung des Dotters die Dottermembran unterhalb des Äquators eingeschnitten. Anschließend wurde der Embryo mit der Hypoblastseite nach oben auf ein Uhrglas übertragen. Hier wurde die Dottermembran ausgebreitet und ein Glasring (Durchmesser 2,1 cm) aufgesetzt. Unter einer Stereolupe wurde die Dottermembran rundherum von außen über den Ring gezogen und der Embryo dabei mittig im Ring platziert. Mit einer feinen, stumpfen Glaspipette mit Locke'scher Lösung wurden Dotterreste vorsichtig von der Dottermembran gespült. In eine Glasbodenschale oder eine kleine Plastikschale wurde etwas vom auch hier zuvor entnommenen Eiweiß gegeben. Der Ring mit der aufgespannten Dottermembran und der Keimscheibe wurde von dem Uhrglas abgeschoben und luftblasenfrei auf das Eiweiß aufgesetzt. Dabei sollte die Dottermembran etwas unter Spannung stehen, sodass sich der Embryo leicht nach oben wölbt. Auch diese Kulturen wurden in einer feuchten Kammer bei 38°C inkubiert.

2.1.3 Behandlung kultivierter Embryonen

Zur pharmakologischen Unterdrückung verschiedener Signalkaskaden und zur Visualisierung von Membrandepolarisationsmustern mit dem Farbstoff DiBAC4(3) wurden die Embryonen in Kultur mit unterschiedlichen Lösungen behandelt. Dazu wurde ein Applikationsvolumen von 10 µl vorsichtig auf den Embryo getropft. Die pharmakologische Behandlung wurde bei allen Experimenten nach 2 h wiederholt. Die Lösungen verblieben auf den Embryonen, bis sie jeweils das gewünschte Stadium erreicht hatten. Anschließend wurden die Embryonen aus der Kultur ausgeschnitten, die Keimscheiben in Locke'scher Lösung von der Dottermembran abgelöst und in Paraformaldehyd (PFA) fixiert (s. 2.1.5).

Von der Substanz SCH28080 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden 10 mg in 1,2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, sodass sich eine Konzentration von 30 mM ergab. Diese Lösung wurde entweder 1:150 oder 1:75 in *phosphate-buffered saline* (PBS) verdünnt, um eine Endkonzentration von entweder 200 µM oder 400 µM zu erhalten.

Für die Substanzen LGK-974 (Selleckchem, München) und Wnt-5C9 (Cellagen Technology, San Diego, USA) wurden mit DMSO Lösungen zu jeweils 10 mM hergestellt, aus denen durch 1:200-Verdünnung in PBS dann Lösungen zu 50 µM hergestellt wurden.

Cyclopamin (Tocris, Bristol, UK) wurde zu einer Konzentration von 5 mM in 100% Ethanol gelöst und in PBS weiter zu 10 µM Lösung verdünnt.

DiBAC4(3) (Biotium, Fremont, USA) wurde in DMSO zu einer Konzentration von 1,25 mg/ml gelöst und zur Verwendung mit PBS auf eine Konzentration von $10 \text{ ng/}\mu\text{l}$ verdünnt.

PBS: 10 mM KH₂PO₄ 0,1 M Na₂HPO₄ 1,37 M NaCl 27 mM KCl in DEPC-*Aqua bidest.*, pH-Wert auf 7,4 einstellen, dann autoklavieren

DEPC-Wasser:1000 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) 1000 ml *Aqua bidest*.

2 h bei RT inkubieren, dann autoklavieren

2.1.4 Membrandepolarisationsmessungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3)

DiBAC4(3) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in Abhängigkeit von der Depolarisation der Plasmamembran innere Zellmembranen färbt. Da es sich um einen linearen Zusammenhang zwischen der Höhe der Depolarisation und der aufgenommenen Menge des Fluorophors handelt, kann die Fluoreszenz als direktes Maß für die Höhe der Depolarisation verwendet werden (Epps et al. 1994). 20 µl der DiBAC4(3)-Lösung (s. 2.1.3) wurde auf Embryonen der Stadien HH 3+ bis HH 4+ in Durchlicht-Kulturen aufgetropft. Nach der Applikation erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 38°C. Vor dem Mikroskopieren wurde die DiBAC4(3)-Lösung mit Locke'scher Lösung abgespült. Auf Kontrollembryonen wurden 20 µl einer 1:125 DMSO-Lösung in PBS aufgetropft. Die Aufnahmen der Embryonen erfolgten mit dem Mikroskop Axioplan2 (Carl Zeiss, Oberkochen) als Auflicht- und als Durchlichtaufnahmen. Die Aufnahmen wurden visuell ausgewertet und in drei Gruppen untereilt: (1) linksseitig stärkere, (2) symmetrische und (3) rechtsseitig stärkere Fluoreszenz.

2.1.5 Fixierung und Lagerung der Keimscheiben

Zur Fixierung der Keimscheiben wurden diese in 4% PFA in PBS oder in 1,5% Glutaraldehyd in PBS für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend in PBS übertragen. Embryonen, die zunächst in Kultur gehalten wurden, wurden durch das Auftropfen von ca. 20 µl PFA-Lösung kurz vor dem Herausschneiden und anschließendem Ablösen von der Dottermembran vorfixiert und danach für 1 h in 4% PFA nachfixiert. Danach wurden die Keimscheiben in PBS übertragen und rechteckig zurechtgeschnitten. Zur Orientierung im weiteren Verlauf wurde an allen Keimscheiben auf der rechten Seite des Embryos am anterioren Ende der Keimscheibe die Ecke des extraembryonalen Gewebes abgeschnitten. Zur Dokumentation wurden alle Keimscheiben mithilfe der Stereolupe Stemi SV 11 (Carl Zeiss, Oberkochen) fotografiert und anschließend das Stadium bestimmt (s. 2.1). Für Immunfärbungen wurden die Keimscheiben bis zu ihrer Verwendung in PBS bei 4°C gelagert. Embryonen für die *In-situ*-Hybridisierung wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe bei 25%, 50%, 75% und 100% Ethanol in Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) auf Eis für jeweils 5-10 min entwässert. Die Lagerung erfolgte in 100% Ethanol bei -20°C.

4% PFA:	4% Paraformaldehyd
	in PBS
1,5% Glutaraldehyd:	1,5% Glutaraldehyd
	in PBS

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die hier verwendeten molekularbiologischen Methoden dienen innerhalb der vorliegenden Arbeit der Herstellung von cRNA-Sonden zur Verwendung in der *In-situ*-Hybridisierung. Die Sonden sind Polynukleotide, die durch Anlagerung an komplementäre Polynukleotide und anschließende Farbreaktion spezifisch deren Vorkommen nachweisen können. Die verwendeten Sonden wurden anhand von bekannten Sequenzen kloniert, von denen einige freundlicherweise von anderen Laboren zur Verfügung gestellt worden waren (s. Tabelle im Anhang unter 6.1.9). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zur Herstellung von cRNA-Sonden beschrieben

Alle entstandenen Abfälle und Kulturreste wurden gemäß den Bestimmungen zu Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen vor der Entsorgung autoklaviert.

2.2.1 Gewinnung von RNA aus Gewebe

Zur Gewinnung von RNA wurde das RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden) verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten zwei Hühnerembryonen im Stadium HH 10. Die Präparation wurde nach dem im Kit mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Abschließend wurde eine
Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung durchgeführt (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg). Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.2 Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurde eine Menge von etwa 2 µg RNA mit 1 µl der Primer-Lösung CDSII-A (Biomers, Ulm) versetzt, mit RNase freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und bei 70°C für 5 min inkubiert. Danach wurden auf Eis 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonukleaseinhibitor und 2 µl dNTP-Mix hinzugefügt und für 4 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl der Enzymlösung der reversen Transkriptase (Invitrogen, Karslruhe) hinzupipettiert und für 1 h bei 42°C inkubiert (Thermocycler PTC-200, Biozym, Oldendorf). Zuletzt wurde das Enzym durch Erhitzen für 10 min auf 70°C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. 2 µl der cDNA wurden mit 5 µl 5x-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl dNTP-Lösung, 36 µl Wasser und 1 µl der Taq-Polymerase (Roche, Mannheim) versetzt. Außerdem wurde jeweils 1 µl der beiden verwendeten Primer hinzugefügt, die die zu amplifizierende Sequenz festlegen. Die Primersequenzen wurden mit der Online-Freeware Primer 3 bestimmt und bei der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler für 1 min auf 95°C erhitzt, dann folgten 40 Zyklen aus jeweils 30 s bei 95°C, 30 s bei 60°C und abhängig von der erwarteten Fragmentlänge meistens etwa 1 min bei 72°C. Abschließend erfolgte eine Erhitzung auf 72°C für 12 min.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Längenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung 1%iger Agarosegele wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer erhitzt, bis sich die Agarose vollständig löste. Anschließend wurde die Lösung etwas abgekühlt, mit 2,5 µl MidoriGreen (Nippon Genetics Europe, Düren) versetzt und in eine Gelgießkammer, in der durch einen Kamm Taschen im Gel entstanden, gegossen und dort abgekühlt. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit 6-fach-Auftragspuffer (Fermentas, Schwerte) vermischt und anschließend in die Kammern pipettiert.

Bei RNA-Proben wurde 1 µl der Lösung mit 9 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Das Gemisch wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt, um Sekundärstrukturen zu lösen. Nach dem Versetzen mit 2 µl Orange G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen.

Zur Abschätzung der Länge der Fragmente wurde zusätzlich der GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo-Scientific, Schwerte) aufgetragen, der Fragmente von 100-3.000 bp

Länge umfasst. Die Gele wurden in einer Kammer mit TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 5-10 V/cm bis zur vollständigen Auftrennung der Fragmente bei RT inkubiert. Auf einem UV-Tisch (EpiChem3 Darkroom, Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge) wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und zur Auswertung fotografiert.

TAE-Puffer:	40 mM Tris
	20 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
	In Aqua bidest. lösen
RNA-Probenpuffer:	10% 10x 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)
	50% deionisiertes Formamid
	40% DEPC-Aqua bidest.

2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte wurden mithilfe des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente wie beispielsweise PCR-Produkte für die *In-vitro*-Transkription zugänglich zu machen oder sicher vor Zerfall über lange Zeit zu lagern, wurden sie in bakterielle Plasmid-DNA mithilfe einer Ligationsreaktion eingebracht. Dazu wurden 5 µl der aufgereinigten DNA mit 1 µl des linearisierten Plasmids pGEM®-T easy, 2 µl 5x Rapid Ligation Puffer, 1 µl Wasser und 1 µl T4-Ligase versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet (s. 2.2.8).

2.2.7 Herstellung elektrisch kompetenter DH5α-Bakterien

Zur elektrischen Transformation, der Einbringung von Plasmid-DNA in Bakterien mithilfe von elektrischem Strom, wurden die Bakterien zuvor elektrisch kompetent gemacht. Dazu wurde eine Kolonie DH5α-Bakterien in 5,5 ml *lysogeny broth*- (LB) Flüssigmedium übertragen und über Nacht ohne Zugabe eines Antibiotikums bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 150 ml LB-Medium angeimpft und für etwa 2-3 h ebenfalls bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀, photometrisch bestimmte Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm, Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) von 0,5-0,7 wurde der Kulturansatz für 20 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4.000 g bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 50 ml 10% Glycerol resuspendiert und wieder bei 4.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml 10% Glycerol resuspendiert und für 15 min bei 4°C und 4.000 g zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 1-2 ml 10% Glycerol resuspendiert, aliquotiert und in Flüssigstickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

LB-Flüssigmedium:	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	In 950 ml Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 9,5 einstellen, dann
	autoklavieren
10%-Glycerol:	126 g Glycerin
	In 900 ml Aqua bidest. lösen, dann autoklavieren

2.2.8 Elektrische Transformation von DH5α-Bakterien

Die elektrokompetenten Bakterien wurden für etwa 5 min auf Eis aufgetaut. Die Bakteriensuspension wurde nach dem Hinzufügen von 2 µl eines Ligationsansatzes (s. 2.2.6) durch Verrühren mit der Pipettenspitze gemischt. Dieser Ansatz wurde für etwa 1 min auf Eis inkubiert und anschließend vorsichtig in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (MicroPulser[™], BioRad, München) übertragen. Die Bakteriensuspension sollte sich nun luftblasenfrei zwischen den beiden Kontakten der Küvette befinden. An die Küvette wurde dann im Elektroporator (MicroPulser[™], BioRad, München) für etwa 4-5 ms eine Spannung von 1,8 kV angelegt. Anschließend wurde zügig 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und die Suspension in ein Reaktionsgefäß übertragen und für 1 h bei 37°C inkubiert.

SOB-Medium:	10 g Trypton
	2,5 g Hefeextrakt
	0,25 g NaCl
	0,14 g KCl
	In 450 ml Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und auf 500 ml
	mit Wasser auffüllen, dann autoklavieren und vor Gebrauch 2,5 ml 2 M
	MgCl ₂ hinzugeben
SOC-Medium:	100 ml SOB-Medium (super optimal broth)
	1 ml 1 M MgCl2
	1 ml 1 M MgSO4
	2 ml 1 M Glukose

2.2.9 Anzucht transformierter DH5a-Bakterien

Nach einer Elektroporation oder zum Vereinzeln von Bakterien nach dem Auftauen eines Bakterienstocks wurden Bakterien auf LB-Agarplatten aufgebracht. Dazu wurden etwa 100-200 µl der Bakteriensuspension entweder direkt oder nach einer geeigneten Verdünnung auf die Platte pipettiert. Anschließend wurde mit einem abgeflammten Drigalski-Spatel so lange über die Platte gestrichen, bis der Agar die Flüssigkeit vollständig aufgenommen hatte. Dabei wurde die Platte abschnittsweise so bestrichen, dass es zu einem Verdünnungseffekt kam und das Wachstum einzelner Kolonien möglich war. Das Medium der Platten enthielt je nach Resistenz der Bakterien ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion. Bakterien, die nach der Elektroporation eines ligierten pGEM®-T easy-Vektors ausplattiert wurden, wurden auf Platten aufgebracht, die sowohl 100 µl IPTG als auch 20 µl X-Gal enthielten, um eine visuelle Selektionsmöglichkeit der rekombinanten Bakterien zu erreichen. Die Platten wurden anschließend umgedreht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien zur Vervielfältigung von Plasmiden in etwa 3-5 ml LB-Flüssigmedium übertragen, die ebenfalls ein Antibiotikum enthielten. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.2.10 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen wurde das Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von der Firma Eurofins, (Hamburg) unter Angabe der zu verwendenden Primer durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Online-Freeware inra align.

2.2.12 Anlegen eines Glycerol-Bakterienstocks

Um Bakterien und insbesondere Plasmide langfristig zu lagern und immer wieder neu wachsen lassen zu können, wurden Bakterien in Glycerol-Bakterienstocks tiefgefroren. Dazu wurden 600 µl der Bakteriensuspension einer Flüssigkultur mit 400 µl eines 1:1 Glycerol-LB-Medium-Gemisches versetzt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Um die Bakterien aufzutauen, wurde etwas von der Oberfläche des Stocks mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in flüssiges LB-Medium ohne Antibiotikum übertragen, das dann für etwa 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden von dieser Flüssigkultur etwa 200 µl auf eine LB-Agar-Platte mit Antibiotikum aufgebracht (s. 2.2.9).

2.2.13 Herstellung einer cRNA-Sonde

cRNA-Sonden wurden in der *In-situ*-Hybridisierung zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuremolekülen innerhalb der fixierten Gewebe verwendet. Sie sind komplementär zur nachzuweisenden mRNA und lagern sich daher an diese an. Eine anschließende Farbreaktion visualisiert das Vorkommen der gesuchten Transkripte.

Zur Herstellung der cRNA-Sonde wurden 200 ng der aufgereinigten Template-DNA mit 2 μ l der DIG-NTP-Lösung (labeling mix), 2 μ l des 10x-Transkriptionspuffers und 1 μ l der entsprechenden (variiert je nach verwendetem Plasmid) Polymerase versetzt und mit DEPC-Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 2 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert.

Anschließend wurde ein Gemisch aus 1,5 μ l 0,4 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 3,75 μ l 4 M LiCL hinzupipettiert, um die Reaktion zu beenden und die RNA nach Zugabe von 100 μ l reinen Ethanols bei -20°C über Nacht zu fällen.

Als RNA-Polymerasen wurden die Sp6- und die T7-Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Somit wurde sowohl eine *sense-* als auch eine *antisense-*Sonde hergestellt. Die *antisense-*Sonde stellt dabei die Probe dar, die komplementär zur nachzuweisenden mRNA ist. Die *sense-*Sonde wurde in diesem Versuchsaufbau jeweils bei der Etablierung der Sonde in der *In-situ-*Hybridisierung (s. 2.2.14) als Negativkontrolle verwendet. In den damit gefärbten Keimscheiben sollte sich keine Farbreaktion ergeben.

Am Folgetag wurde der Ansatz bei 4°C und 13.000 g für 45 min zentrifugiert, sodass die ausgefällte RNA pelletierte. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Hinzugabe von 50 µl 70% Ethanol und Zentrifugation bei 4°C und 13.000 g für 5 min gewaschen. Nach Verwerfen des Überstands wurde ein Gemisch aus 50 µl DEPC-Wasser und 5 µl 4 M LiCl hinzugegeben und 150 µl 100% Ethanol hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 1 h bei -20°C inkubiert und bei 4°C und 13.000 g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 50 µl 70% Ethanol hinzugegeben und bei 4°C und 13.000 g für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet durch Zentrifugation in einer Vakuumzentrifuge für 5 bis 10 min getrocknet. Das Pellet wurde in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.4) der Sonde durchgeführt.

2.2.14 In-situ-Hybridisierung

Mithilfe der *In-situ*-Hybridisierung lassen sich Polynukleotide hochgradig spezifisch in Zellen oder Geweben nachweisen.

Die ausgewählten Keimscheiben wurden in kleine Körbchen übertragen, die für die Inkubation in den unterschiedlichen Lösungen in den verwendeten 24-well-Platten weitergesetzt werden können. Die Vertiefungen der 24-well-Platten enthielten dabei meistens jeweils 2 ml der angegebenen Lösungen. Bis zur Farbreaktion dauerte es insgesamt drei Tage, wobei am ersten Tag unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde.

Am ersten Tag wurden die in 100% Ethanol gelagerten Keimscheiben zweimal für jeweils 5 min in 70% Methanol in PBS mit 0,1% Tween 20 (PBT) auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte bei RT auf einer Schaukel für jeweils 5 min in PBT und eine Inkubation für 20 min für Keimscheiben und für 1 h bei den Organpaketen in Stadium HH 32 in Proteinase K (Roche, Grenzach-Wyhlen) in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBT gefolgt von zwei weiteren Waschschritten für jeweils 5 min in PBT. Eine Nachfixierung erfolgte in 0,2%iger Glutaraldehydlösung in PBT (8 µl 25% Glutaraldehyd pro ml PBT). Danach folgten zwei Waschungen in PBT, eine Inkubation für 5 min in einem Gemisch aus 50% Hybemix und PBT und anschließend eine Inkubation für 5 min in Hybemix. Anschließend wurden die Körbchen in Schraubdeckelgläser mit 900 µl Hybemix umgesetzt und für mindestens 1 h bei 70°C inkubiert. Parallel wurden 100 µl Hybemix mit 1-4 µl der entsprechenden cRNA-Sonde gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen. Die so vorbereitete Sonde wurde zu den Körbchen in die Schraubdeckelgläser pipettiert und über Nacht bei 70°C inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgten zunächst zwei kurze Waschschritte mit jeweils 1 ml des vorher erhitzten Hybemix bei 70°C. Anschließend wurden die Keimscheiben zweimal für je 30 min in jeweils 2 ml Hybemix gewaschen. Ein letzter Waschschritt erfolgte in einem Gemisch aus 1 ml Hybemix mit 1 ml MABT.

Die folgenden Schritte fanden wieder bei RT unter Schwenken in 24-well-Platten statt und wurden unsteril durchgeführt. Die Keimscheiben wurden dreimal für jeweils etwa 10 s in 1,5 ml *maleic acid buffer containing* Tween 20 (MABT) gewaschen, dann folgten zwei Waschschritte für jeweils 30 min in 2 ml MABT. Danach erfolgte eine Inkubation für 60 min in 1 ml einer Mischung aus 16,8 ml MABT und 4,2 ml Boehringen Blocking Reagenz (Mengenangabe als Ansatzlösung für 6 Körbchen). Der Rest dieses Gemisches wurde mit 3,6 ml *normal-goat-serum* (NGS) versetzt. Die Keimscheiben wurden für 60 min in 1 ml dieser Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Anti-DIG-Antikörper (Roche, Grenzach-Wyhlen) zu blocken. 6 µl dieses Antikörpers wurden dem Rest der Lösung hinzugefügt und die Keimscheiben in je 2 ml Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Keimscheiben dreimal für jeweils etwa 10 s in MABT gewaschen. Anschließend erfolgten die Inkubationsschritte in größeren Trögen auf einer Schaukel. Zunächst wurden die Keimscheiben siebenmal für jeweils 10 min in MABT gewaschen. Anschließend erfolgte viermal eine Inkubation für jeweils 10 min in NTMT. Die Keimscheiben wurden dann jeweils zweimal kurzzeitig in BM-Purple inkubiert, um NTMT auszuwaschen. Abschließend wurden die Keimscheiben in Organkulturschalen (Corning, Kaiserslautern) übertragen, in denen sich in der Mitte die BM-Purple-Lösung befand und im äußeren Ring NTMT. In einer Dunkelkammer fand die Farbreaktion bei RT statt. Die Keimscheiben wurden regelmäßig begutachtet und nach ausreichender Farbentwicklung (je nach Sonde 2 Stunden bis 2 Wochen), in den NTMT-Puffer übertragen. Anschließend wurden die Keimscheiben unter einem Deckglas fotografiert. Dazu wurde die Stereolupe Stemi SV11 (Zeiss, Oberkochen) mit entweder der SPOT Insight Wide-field 4 Mp Monochrome FireWire Digital Camera with IR Filter (Visitron Systems, Puchheim) oder der Axiocam 305 (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Anschließend erfolgte entweder die Einbettung der gefärbten Keimscheiben in Technovit® (s. 2.3.1) oder deren Lagerung in Glycerin bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

Hybemix: 25 ml Formamid 3,5 ml 20x *saline sodium citrate* SSC 0,05 ml 0,5 M EDTA 0,25 ml t-RNA (10 mg/ml)

	0,1 ml Tween 20 2,5 ml 10% Chaps 0,05 ml Heparin (50 mg/ml) 18,6 ml DEPC- <i>Aqua bidest</i> .
PBT:	0,1% Tween 20 In PBS
MABT:	100 ml Maleinsäure 100 ml 1,5 M NaCl 1 ml Tween 20 In 600 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 10 M Natronlauge auf 7,5 einstellen und auf 1000 ml mit <i>Aqua bidest.</i> auffüllen
NTMT:	 50 ml 1 M Tris 10 ml 5 M NaCl 25 ml 1 M MgCl₂ 1000 μl Levamisol 500 μl Tween 20 In 300 ml Wasser lösen, pH-Wert mit 2 M Salzsäure auf 9,5 einstellen und auf 500 ml mit <i>Aaua bidest.</i> auffüllen

2.3 Histologische und mikroskopische Methoden

2.3.1 Herstellung von Technovit®-Schnitten

Zur Zuordnung der in der *In-situ*-Hybridisierung oder in immunhistochemischen Färbungen an ganzen Keimscheiben (s. 2.3.7) gefärbten Strukturen zu den Keimblättern wurden die gefärbten Embryonen in dem drei-Komponenten-Kunststoff Technovit® 8100 (Kulzer, Wehrheim) eingebettet, um sie anschließend schneiden und histologisch untersuchen zu können.

Zu dieser Einbettung in Technovit® wurden gefärbte, in Glycerin gelagerte Embryonen zunächst für 30 min in PBS überführt und so vom Glycerin befreit. Anschließend wurde die Keimscheibe auf einen Objektträger übertragen und durch Auflegen eines Deckglases geglättet. Nach Entfernen des Deckglases wurde die PBS-Lösung weitgehend abgesaugt, der Embryo mit dem Einbettmedium Mowiol umgeben und vorsichtig und luftblasenfrei mit einem Deckglas bedeckt. Die Aushärtung des Mowiols erfolgte bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurde der Objektträger für 1 h in ein Bad aus 90% Methanol in Wasser gelegt und das Deckglas anschließend entfernt. Der Embryo wurde in 100% Methanol überführt. Ein initial wenig gewölbter Embryo wurde ohne Einbettung in Mowiol in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100% Methanol in DEPC-Wasser) für jeweils 15 min entwässert.

Zur Herstellung des Technovit® wurde zunächst aus 100 ml Technovit®-Medium und 0,6 g Härter I das Infiltrationsmedium hergestellt und auf Eis gelagert. Zur Positionierung der Keimscheiben bei der Einbettung wurden kleine Scheiben aus Technovit® am Vortag der Einbettung hergestellt. Dazu wurden 3 ml des Infiltrationsmediums mit 250 µl Härter II versetzt woraufhin diese Mischung in Leergelatinekapseln luftblasenfrei eingefüllt wurde. Die Aushärtung erfolgte über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurden aus den so entstandenen Technovit®-Stäben nach deren Erwärmung die benötigten Scheiben mit einer Klinge geschnitten.

Die entwässerten Keimscheiben wurden in Infiltrationsmedium für 5 min von Methanolresten befreit und anschließend für 2 h in Infiltrationsmedium inkubiert. Danach wurde Technovit® zur Einbettung der Keimscheibe durch Hinzugabe von 250 µl Härter II zu 6 ml Infiltrationsmedium hergestellt. Die Einbettung wurde in runden Tablettenhülsen vorgenommen, in die Technovit®-Scheiben gelegt wurden. Die Hülsen wurden mit der Technovit®-Lösung aufgefüllt. Pro Hülse wurde jeweils eine Keimscheibe auf der Technovit®-Scheibe gemäß der gewünschten Schnittrichtung ausgerichtet. Die Hülse wurde luftblasenfrei mit Plastikblättchen abgedeckt und zur Aushärtung bei 4°C auf einem Metallblock über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Technovit®-Block zurechtgetrimmt und anschließend fotografiert.

Die Schnitte wurden mit dem Mikrotom Jung RM 2065 (Leica, Nußloch) angefertigt. Auf den Objektträger (Menzelgläser, Thermo-Fisher Scientific, Schwerte) wurden Tropfen aus 25% Ethanol in DEPC-Wasser aufgebracht, auf denen die Schnitte platziert und ausgebreitet wurden. Die Trocknung erfolgte auf einer Heizplatte (4P100 50Hz, Gowina-Hofmann, Berlin). Die Schnitte werden mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss, Oberkochen) fotografiert.

2.3.2 Herstellung von Semidünnschnitten

Zur Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten wurden Keimscheiben in Araldit® (Serva, Heidelberg) eingebettet. Dafür wurden präparierte Keimscheiben (s. 2.1.1) in einem Gemisch aus 1,5% Glutaraldehyd und 1,5% PFA in PBS für mindestens 2 h bei RT fixiert und dann in PBS für 5 min gewaschen. Eine weitere Fixierung erfolgte mit 1% Osmium-Lösung in PBS für 2 h. Anschließend wurden die Keimscheiben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90% und 100% in DEPC-Wasser) für jeweils 10 min entwässert und dann 2-mal für jeweils 5 min in Propylenoxid inkubiert. Daraufhin wurden die Keimscheiben in einer zweistufigen Propylenoxid-Araldit®-Reihe mit dem Araldit® für jeweils 1 h infiltriert (1:1 und 1:3). Danach erfolgte eine Inkubation bei 60°C für 30 min in reiner Araldit®-Lösung. Zur Vorbereitung der eigentlichen Einbettung wurde eine Tablettenhülle zur Hälfte mit Araltid® gefüllt, das bei einer Temperatur von 60°C über 72 h aushärtete. Darauf wurde die Keimscheibe mit etwas flüssigem Araldit® platziert und gemäß der gewünschten Schnittrichtung mit feinen Wolframdrähten ausgerichtet. Die

Tablettenhülle wurde anschließend vollständig mit Araldit®-Lösung gefüllt und für 72 h bei 60°C auspolymerisiert (Schwartz et al. 1984; Tsikolia et al. 2012). Die so eingebetteten Keimscheiben wurden zunächst mithilfe der *Spot-light-illumination*-Mikroskopie mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss, Oberkochen) fotografiert. Dazu wird die Lichtquelle so stark in ihrer Leuchtfläche reduziert, dass nur noch das zu untersuchende Objekt beleuchtet wird. Anschließend wurden die Blöcke mit dem Mikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, jetzt Leica, Nußloch) in 1 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Färbung erfolgte mit einer Färbelösung nach Richardson (Richardson et al. 1960) durch Auftropfen der Färbelösung auf den Objektträger. Sobald sich die Lösung golden verfärbte (nach etwa 30 s), wurde sie abgewaschen und die Objektträger wurden getrocknet. Die Dokumentation erfolgte mit dem Mikroskop Axioplan2 unter Verwendung des Immersionsöls ImmersolTM 518F (Carl Zeiss, Oberkochen).

Färbelösung nach Richardson: 100 ml 1% Azur II

mit 100 ml eines 1:1-Gemisches aus 1% Methylenblau und 1% Natriumtetraborat (Borax) mischen und sterilfiltrieren

2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Semidünnschnitte, die Strukturen enthielten, die in ihrer Ultrastruktur untersucht werden sollten, wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) weiter aufgearbeitet. Die Semidünnschnitte mussten dafür umgebettet werden. Die Objektträger wurden mit dem Schnitt nach unten auf Kapseln aufgelegt, die zu zwei Dritteln mit ausgehärtetem und einem Drittel mit flüssigem Araldit® gefüllt waren. Die Aushärtung erfolgte für 72 h bei 60°C. Mithilfe flüssigen Stickstoffs wurde der Objektträger abgesprengt, wobei der Semidünnschnitt auf dem Araldit®-Block verblieb. Anschließend wurde dieser mit dem Mikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, jetzt Leica, Nußloch) in 50 nm dicke Schnitte geschnitten, die auf Grids aufgebracht und mit dem Kontrastiergerät EMAC20 (Leica, Nußloch) kontrastiert wurden (Hassoun et al. 2009). Dokumentiert wurden die Ultradünnschnitte mit dem Transmissionselektronenmikroskop TEM LEO 906E (Carl Zeiss, Oberkochen).

2.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Zur ultrastrukturellen Darstellung von Oberflächenstrukturen wurde die Rasterelektronenmikroskopie verwendet. Dafür wurden fixierte Keimscheiben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) entwässert und mit der *Criticalpoint-*Technik unter der Verwendung von CO₂ getrocknet. Anschließend wurden die Keimscheiben mit Leitsilber auf einem Aluminiumträger befestigt, mit einer Platin-Palladium-Schicht in einer Dicke von 10-20 nm bedampft (Feinvakuum-Coater EM ACE200, Leica, Nußloch) und mit dem Feldemissionsrasterelektronenmikroskop Zeiss Ultra Plus (Carl Zeiss, Oberkochen) aufgenommen. Anschließend wurden die Präparate von anterior her mit feinen Wolframdrähten schrittweise gebrochen. Dabei entstehen die meisten Bruchkanten entlang von natürlichen Grenzen wie beispielsweise Zellgrenzen oder der Basalmembran. Einzelne Zellen werden nicht entlang ihrer Grenzen gebrochen, sondern die Bruchkanten entstehen durch das Innere der Zelle. Die Präparate wurden so gebrochen, dass die Bruchkante etwa auf Höhe des Hensen-Knotens entstand. Die Embryonen wurden nach dem Brechen jeweils wiederum bedampft und standen so für Aufnahmen der inneren Strukturen bereit.

2.3.5 Live-imaging

Zur Beobachtung der Morphogenese früher Embryonen wurden im Rahmen dieser Arbeit Membran-GFP-transgene Hühnerembryonen (Rozbicki et al. 2015) verwendet und in New-Kultur genommen (s. 2.1.2.2). So konnte derselbe Embryo in definierten Abständen von 3 min fortlaufend unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert werden. Aus den einzelnen Bildern wurde eine Filmsequenz erstellt, in der Zellbewegungen und Massenbewegungen innerhalb des Embryos in unterschiedlichen Entwicklungsstadien visualisiert wurden. Dazu wurde das inverse Mikroskop Axiovert 200M Trinocular Phase Contrast Fluorescence Inverted Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet, das mit einer XL-3 Inkubations-Kammer ausgestattet war. Zur Temperierung der Kammer auf 38°C wurde das Tempcontrol 37-2 digital (Meyer Instruments, Houston, Texas, USA) benutzt. Die automatische Aufnahme der Bilder erfolgte mithilfe der Software AxioVision, Release 4.6.3. Das Zusammenfügen der Einzelbilder zu einer Filmsequenz erfolgte mit ImageJ.

2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung ganzer Keimscheiben

Immunfärbungen zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden an ganzen frisch fixierten Keimscheiben durchgeführt. Alle Schritte erfolgen in 24-well-Platten in Volumina von 1-2 ml. Die PFA-fixierten Keimscheiben (s. 2.1.5) wurden zunächst 3-mal für jeweils 5 min bei RT in PBT gewaschen. Danach erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% NGS in PBS für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Keimscheiben über Nacht bei RT mit einer geeigneten Verdünnung des gewählten Primärantikörpers (s. Tabelle A5 im Anhang unter 6.1.5) in PBT mit 0,1% NGS inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschritte für jeweils 5 min bei RT. Die Inkubation mit dem gewählten Sekundärantikörper erfolgte für 60 min bei RT. Anschließend wurde 3-mal für jeweils 5 min mit PBT gewaschen. Eine Gegenfärbung erfolgte entweder mit dem Kernfarbstoff DAPI (Serva, Heidelberg), mit dem Aktin-Farbstoff Phalloidin (Abcam, Cambridge, UK) oder mit beiden. Es folgten jeweils 3 Waschungen für 5 min in PBT. Die gefärbten Keimscheiben wurden auf Objektträger übertragen. Überschüssiges PBT wurde abgesaugt. Die Keimscheiben wurden mit einem 1:1-Gemisch aus Mowiol und 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO) umgeben, ausgerichtet und vorsichtig mit einem

Deckglas bedeckt. Die Präparate wurden nach der Trocknung über Nacht bei 4°C mit dem Axioplan2 (Carl Zeiss, Oberkochen) fotografiert.

2.3.7 Immunhistochemische Färbung ganzer Keimscheiben

Zur immunhistochemischen Färbung wurden PFA-fixierte Keimscheiben (s. 2.1.5) zunächst für 4 min in 10 mM Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 bei 96°C inkubiert und anschließend 3-mal für jeweils 10 min mit PBT gewaschen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch eine Inkubation für 2 h mit 0,3% H2O2 in PBT reduziert. Es folgten drei Waschschritte für jeweils 10 min in PBT und drei Waschschritte für jeweils 30 min in PBT. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine Inkubation für 1 h bei RT in 1% NGS in PBT geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in PBT mit 0,1% NGS verdünnt wurde, erfolgte über drei Tage bei RT unter Schwenken. Nach drei Waschschritten für 10 min in PBT erfolgten drei Waschschritte für 30 min in PBT. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der in PBT mit 0,1% NGS verdünnt wurde, erfolgte bei 4°C über Nacht unter Schwenken. Nach drei Waschschritten für jeweils 10 min in PBT wurden die Keimscheiben für 1 h in Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Lösung (ABC) R.T.U. Vectastain® Kit (Vector, Burlingame) bei RT inkubiert und dreimal für 10 min in PBT gewaschen. Für die Farbreaktion wurden die Embryonen in einer Lösung mit 500 ng/µl 3,30-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Taufkirchen) und 0,015% H₂O₂ in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,6 bis zur Entwicklung einer ausreichenden Färbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurze Inkubation in PBS gestoppt. Anschließend wurden die Embryonen auf Objektträger übertragen, mit Mowiol umgeben und mit einem Deckglas bedeckt. Nach der Trocknung über Nacht wurden sie fotografiert (Stemi SV 11, Carl Zeiss, Oberkochen). Außerdem wurden die so gefärbten Embryonen teilweise in Technovit® eingebettet und anschließend geschnitten (s. 2.3.1).

Zitratpuffer: 3 ml 100 mM Zitronensäure 17 ml 100 mM Natriumzitrat mischen und mit 1 M Natronlauge, pH-Wert auf 6,0 einstellen, dann 1:10 in Aqua bidest. verdünnen

2.4 Verwendete Programme

Die Erstellung der Listen und Tabellen erfolgte mit dem Programm Excel 2010 (Microsoft). Die Abbildungen dieser Arbeit wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS6 (64 Bit) zusammengestellt und bearbeitet.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden gemäß den formulierten Zielen dieser Arbeit (1.5) zunächst die Befunde vorgestellt, die einen direkten Bezug zur Zilienstrom-Hypothese der Symmetriebrechung haben. Dabei wird zuerst auf die Ultrastruktur der Asymmetrie des Hensen-Knotens eingegangen. Dann erfolgt die Charakterisierung der mit extrazellulärer Matrix gefüllten intraepithelialen Räume. Am Ende des ersten Ergebnisteils werden mit den Expressionsmustern von *Foxj1* und *Rechts-Links-Dynein* auch molekulare Daten zur Zilienstrom-Hypothese vorgestellt. Im zweiten Abschnitt werden die Komponenten der Ionenfluss-Hypothese auf molekularer Ebene gezeigt. Dies sind die Expressionsmuster der beiden Untereinheiten der ATP4, die Membrandepolarisationsmuster und die Daten zur *Nodal*-Expression nach ATP4-Unterdrückung. Im dritten Teil wird die mögliche Verbindung zwischen den zuvor dargestellten Aspekten thematisiert. Dazu werden die *Foxj1*-Expression nach ATP4-Unterdrückung und die *Nodal*-Expression nach Wnt-Inhibition beschrieben.

3.1 Zilienassoziierte Aspekte der Symmetriebrechung

Um die Anordnung der untersuchten inneren Strukturen des Knotens anschaulich zu machen, werden hier zunächst die morphologische Asymmetrie des Hensen-Knotens beschrieben und danach die Expressionsmuster der Zilien-assoziierten Gene Foxj1 und Rechts-Links-Dynein vorgestellt.

3.1.1 Rasterelektronenmikroskopie der entstehenden Asymmetrie im Hensen-Knoten

Die Bruchkanten der rasterelektronenmikroskopischen Präparate (s. 2.3.4) der Stadien HH 4 und HH 5 entstanden überwiegend entlang von Zellgrenzen und der Basalmembran ventral des Epiblast und dorsal des Hypoblast. Einige Zellen wurden jedoch auch durchgebrochen, sodass deren innere Strukturen sichtbar wurden. An Keimscheiben, die im Knotenbereich gebrochen waren, zeigte sich die Morphologie der Zellen des Epiblast und des darunter liegenden Mesoderm (Abb. 5). Bei Keimscheiben, bei denen nur der Epiblast von anterior her bis zum Knoten entfernt wurde, ließ sich in der Aufsicht das darunter liegende Mesoderm beurteilen (Abb. 5B).



Abb. 5: Hensen-Knoten und axiales Mesoderm in der Rasterelektronenmikroskopie. (A) Rasterelektronenmikroskopische Frontalansicht eines im Knotenbereich gebrochenen Embryos in Stadium HH 4. (A') Aufsicht auf den Knotenbereich in Stadium HH 4. (B) Schräge Frontalansicht auf einen Embryo in Stadium HH 5, bei dem von anterior her bis zum Knoten der Epiblast entfernt wurde. (B') Aufsicht auf den Hensen-Knoten und das axiale Mesoderm. Das schwarze Rechteck zeigt die Position des Einschubs in B'. Die Maßstabsbalken in A, A' und B' geben jeweils eine Länge von 20 µm an, A und B sind Aufnahmen bei gleicher Vergrößerung, der Einschub in B' hat die gleiche Vergrößerung wie A' (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

Die Zellen des Epiblast im Hensen-Knoten unterschieden sich von den Zellen des umliegenden Epiblast in Stadium HH 4 wie folgt: Die Zellen im Hensen-Knoten zeigten eine gekrümmte Form. Ihre basalen Anteile lagen weiter peripher als die apikalen Anteile. Dadurch war ihre Längsachse gekrümmt und die Zellen neigten sich von lateral zur Mittellinie hin. Die Zellen der Mittellinie neigten sich ebenfalls von anterior her nach posterior, also zur Primitivgrube im Zentrum des Hensen-Knotens. Diese Zellen formten gemeinsam eine Art Kuppel (Abb. 5A, A' und B). Die Krümmung der Zellen im Hensen-Knoten war in Stadium HH 5 stärker ausgeprägt als in Stadium HH 4. Die Zellen des umgebenden Epiblast bildeten eine Schicht aus dicht aneinander stehenden Zellen. Ihre Längsachsen standen orthogonal zur unterliegenden Basalmembran, sodass sich ein palisadenartiges Bild ergab. Die apikalen Anteile der Zellen lagen hier demnach senkrecht oberhalb ihrer basalen Anteile (Abb. 5A). Die wenigen gebrochenen Zellen zeigten insbesondere in Stadium HH 5 kraterartige Vertiefungen. Die Zellen des Hensen-Knotens glichen sich morphologisch auf der rechten und auch der linken Seite (Abb. 5B). Allerdings zeigte sich in der Aufsicht die oberflächliche Asymmetrie des Knotens: Die rechte Knotenschulter lag schräg anterior der linken Knotenschulter und war nach dorsal stärker gewölbt als die linke Knotenschulter. Die Längsachsen der Primitivrinne und der Primitivgrube im Hensen-Knoten bildeten anterior einen spitzen Winkel von etwa 45° (Abb. 5B^c). Die Längsachse der Primitivrinne verlief in anterior-posteriorer Richtung. Die Längsachse der Primitivgrube stand in dieser Richtung schräg zum linken vorderen Ende des Embryos. In Stadium HH 4 gingen die Längsachsen des Primitivstreifens und des Knotens direkt ineinander über.

An einigen Stellen war ventral des Epiblast und dorsal des Hypoblast die Basalmembran erkennbar (s. Abb. 5A, unterer rechter Bildrand). Diese zeigte ein filzartig verwobenes Netz aus Fasern (Vgl. Abb. 11D).

Die Frontalansicht eines gebrochenen Embryos in Stadium HH 4 zeigte einen lockeren Zellverband des Mesoderm (Abb. 5A). Die leeren Räume zwischen den Zellen des axialen Mesoderm waren allerdings enger als im umliegenden Mesoderm. Die mesenchymalen Zellen selbst unterschieden sich morphologisch nicht voneinander. In Stadium HH 5 unterschied sich das axiale Mesoderm allerdings vom umliegenden Mesoderm (Einschub in Abb. 5B'). Die Zellen des axialen Mesoderm lagen dicht beieinander und bildeten nur wenige Zellfortsätze aus. In der Aufsicht war unter dem abgelösten Epiblast die homogene dorsale Oberfläche der *Chorda dorsalis* zu sehen. Hier traten nur sehr wenige interzelluläre Lücken auf. Die Zellen des umliegenden nichtaxialen Mesoderm hingegen lagen locker verteilt. Sie bildeten über zahlreiche Zellfortsätze Zell-Zell-Kontakte mit vielen Nachbarzellen aus, sodass eine netzartige Struktur entstand. Die weiten Interzellularräume im nichtaxialen Mesoderm erschienen leer (Abb. 5B').

3.1.2 Lebendbeobachtung (live-imaging) der Knotendrehung

In den Membran-GFP-transgegen Hühnern in Kultur (s. 2.1.2.2) zeigte sich die Entwicklung des Knotens von symmetrischen Knotenstadien bis zum asymmetrischen Knoten in einzelnen Embryonen über einen Zeitraum von etwa 8 h (s. 2.3.5). Abb. 6 zeigt drei einzelne Bilder aus der Videosequenz zwischen den Stadien HH 4+ und HH 5 (die Videosequenz befindet sich auf dem beiliegenden Datenträger unter dem Dateinamen Knotendrehung_GFP-Huhn).



Abb. 6: Entstehung der Knotenasymmetrie im *live-imaging*. Dorsalansichten eines kultivierten Membran-GFP-transgenen Hühnerembryos (New Kultur) zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. (A) Stadium HH 4+ zu Beginn der Sequenz. (B) Stadium HH 5- zu Beginn der Knotendrehung. (C) Stadium HH 5 zum Ende der Sequenz. Der schwarze Pfeilkopf zeigt jeweils auf den asymmetrischen Hensen-Knoten. Die eckige Klammer in C zeigt die *Chorda dorsalis*. Die gekreuzten Pfeile in A geben die Orientierung der Keimscheibe an: a: anterior, p: posterior, l: links, r: rechts. Diese Orientierung wurde, wenn nicht anders angegeben, für alle in dieser Arbeit abgebildeten Keimscheiben verwendet.

Zu Beginn der Kultur in Stadium HH 4+ zeigte sich der Hensen-Knoten bereits asymmetrisch mit einer dichteren rechten Knotenschulter. Die beiden Knotenschultern lagen allerdings noch unmittelbar nebeneinander. Die Primitivrinne und die Primitivgrube waren durch ein durchgängiges Fluoreszenzsignal erkennbar, das sich vom wabenartigen Signal der umliegenden Zellen unterschied. Die beiden Achsen der Primitivrinne und der Primitivgrube gingen gerade ineinander über, bildeten also einen Winkel von 0° (Abb. 6A). Die Zeitrafferdarstellung zeigte die fortschreitende Verdichtung der rechten Knotenschulter und die Drehung des Knotens, die durch das starke Fluoreszenzsignal der rechten Knotenschulter teilweise überlagert wurde. Die Knotendrehung selbst war vor allem durch das Fluoreszenzsignal innerhalb der Primitivrinne und der Primitivgrube erkennbar. Deren Achsen lagen ab dem Beginn der Drehung (Abb. 6B) in einem Winkel zueinander, der mit fortschreitender Entwicklung größer wurde. Am Ende der Filmsequenz hatte der Winkel eine Größe von etwa 45° erreicht und der Hensen-Knoten war maximal nach links verdreht. Der Hensen-Knoten war so nach links verdreht, dass die rechte Knotenschulter anterior der linken lag und nach anterior weiter in die Chorda dorsalis überging. Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, wurde diese auch hier von weniger zelldichten Bereichen beidseits flankiert. Die linke Knotenschulter lag weiter posterior und trat in keine unmittelbare räumliche Beziehung zur Chorda dorsalis.

3.1.3 Matrixgefüllte Interzelluarräume (sog. *nodal microcavities)* im Hensen-Knoten

In Semidünnschnitten (s. 2.3.2) kamen zahlreiche interzelluläre Lücken vor. Im Mesoderm lateral der Mittellinie waren die meisten dieser Lücken lokalisiert. Einige davon waren so groß, dass die umgebenden Zellen einen lockeren Zellverband bildeten. Die Lücken waren ungefärbt und entsprachen den leeren Räumen, die in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen im nichtaxialen Mesoderm vorkamen (s. 3.1.1). Die mesenchymalen Zellen des Mesoderm waren vom darüber liegenden epithelialen Epiblast sowohl morphologisch als auch topographisch abgrenzbar: Zwischen den beiden Keimblättern befand sich die Basalmembran, der die epithelialen Zellen des Epiblast aufsaßen. Im Epiblast und Ektoderm lagen die epithelialen Zellen dicht beieinander, sodass sich auch in den Semidünnschnitten ein palisadenartiges Bild ergab (Vgl. 3.1.1). Die Schnitte bildeten ihre gesamte dorsoventrale Ausdehnung von der Oberfläche bis zur Basalmembran ab. Im Hensen-Knoten war diese palisadenartige Struktur nicht mehr durchgängig zu erkennen. Die Zellen waren oft nur teilweise angeschnitten, wobei die Anschnitte verschiedener Zellen entlang der dorsoventralen Achse übereinander lagen (siehe Abb. 2).

Im ansonsten dichten Gewebe des Hensen-Knotens wurden regelmäßig auch die von Carpaij 2014 beschriebenen Gewebslücken vorgefunden. Diese Gewebelücken enthielten – anders als die Lücken im nicht axialen Mesoderm – Material, das hellblau angefärbt war und sich so von der dunkleren Blaufärbung der zellulären Bestandteile und den gelb-grauen intrazellulären Einschlüssen unterscheiden ließ. Die Lücken waren vollständig von Zellen umgeben (Abb. 7).



Abb. 7: Matrixgefüllte Gewebelücke. Schräger Semidünnschnitt durch den Hensen-Knoten eines Embryos in Stadium HH 5. Das schwarze Rechteck in dem Schnittbild zeigt eine gefüllte Gewebelücke, die daneben stark vergrößert dargestellt ist. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 50 µm für die Übersicht und eine Länge von 25 µm für den vergrößerten Bildausschnitt (Dieses Bild entspricht dem in Abb. 2C abgebildeten Schnitt; Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

In der Primitivgrube war vesikuläres und amorphes extrazelluläres Material sichtbar, das abgestorbenen Zellfragmenten entsprach (Abb. 7).

Durch die Korrelation der Semidünnschnitte mit den Übersichtsaufnahmen (Abb. 8) konnten die Matrixgefüllten Gewebelücken der Höhe der Primitivgrube und der unmittelbar anterior davon liegenden Abschnitte zugeordnet werden. Das Vorkommen dieser gefüllten interzellulären Räume beschränkte sich also streng auf den Hensen-Knoten und das von dort auswachsende, noch knotennahe, axiale Mesoderm. Sie waren meistens im Mesoderm des Knotens lokalisiert, kamen aber auch in dessen Epithel vor. Teilweise lagen sie genau auf Höhe der zugunsten der EMT untergehenden Basalmembran. Ihre Position im Hensen-Knoten und der Nachweis der von Carpaji 2014 beschriebenen intraepithelialen Räume auch im Mesoderm führten zur Umbenennung zu "*nodal microcavities*" (NMC).

Jede der gefundenen NMC ließ sich über mindestens zwei benachbarte Semidünnschnitte hinweg verfolgen. So konnte ihre Ausdehnung entlang der drei Körperachsen bestimmt werden. Die Vermessung einer breiten NMC auf Höhe der Basalmembran anterior im Knoten (Vgl. Abb. 8B") ergab eine Ausdehnung von etwa 40 µm entlang der Transversalachse, 12 µm entlang der kraniokaudalen Achse und eine Höhe von 8 µm entlang der dorsoventralen Achse. Andere NMC, die nicht direkt mit der Basalmembran in Verbindung zu stehen schienen, haben beispielsweise die Maße 14 µm entlang der Transversalachse, 17 µm entlang der dorsoventralen und 23 µm entlang der kraniokaudalen Achse.



Abb. 8: Nodal microcavities im Hensen-Knoten. Dorsalansichten (A-D) und transversale Semidünnschnitte (A'-D', A"-D"). Die Stadien der abgebildeten Embryonen sind in der jeweiligen Übersicht angegeben. Der Einschub in B zeigt den Hensen-Knoten detailreicher als in der Übersicht. Die Schnittebenen sind in den Übersichten durch weiße Striche gekennzeichnet. Die schwarzen Rechtecke in den Schnittbildern umrahmen die NMC. Der Maßstabsbalken in D" gibt eine Länge von 50 µm für die Schnitte und eine Länge von 560 µm für die Übersichtsaufnahmen an. Die gekreuzten Pfeile in D" geben die Orientierung der Schnitte an: d: dorsal; v: ventral, l: links, r: rechts. Diese Orientierung wurde, wenn nicht anders angegeben, für alle in dieser Arbeit abgebildeten Schnitte verwendet (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

NMC kamen in allen untersuchten Embryonen ab dem Stadium HH 3+ vor (Abb. 8). In einem einzelnen bisher untersuchten Hühnerembryo in Stadium HH 3 wurden keine NMC gefunden. In Stadium HH 3+ fanden sich zwar NMC, allerdings war noch kein Knoten vorhanden. Außerdem war noch kein axiales Mesoderm ausgewachsen und das Mesoderm lateral des Primitivstreifens lag besonders locker. Die NMC befanden sich hier am anterioren Ende des Primitivstreifens. Auch an dieser Stelle kamen sie auf der Höhe der durchbrochenen Basalmembran vor. In den ältesten hier untersuchten Embryonen (Stadium HH 8) wurden NMC ebenfalls im Bereich des Hensen-Knotens und des knotennahen axialen Mesoderm gefunden (Abb. 8 und Abb. 9).



Abb. 9: *Nodal microcavities* in transversalen und sagittalen Semidünnschnitten. (A-F) Transversale Semidünnschnitte durch Embryonen verschiedener Stadien. (G-L) Sagittalschnitte durch Embryonen verschiedener Stadien. Die Stadien sind beim jeweiligen Schnitt vermerkt. Der Maßstabsbalken in L gibt eine Länge von 50 µm für alle Schnitte an. Der Pfeil in G zeigt für die Sagittalschnitte in G-L Richtung anterior.

Die NMC waren in den Stadien vor der Knotenbildung und im Stadium des symmetrischen Knotens gleichmäßig verteilt und mittig im Hensen-Knoten lokalisiert. In späteren Stadien ab HH 5-, sobald der Knoten seine asymmetrische Morphologie bildete, befanden sie sich überwiegend in der rechten Knotenschulter. In der linken Schulter waren sie eher selten zu finden. Die NMC im axialen Mesoderm lagen in der dichten mesodermalen Zelllage entweder direkt dort, wo das axiale Mesoderm aus den Zellen der rechten Knotenschulter entstand, oder kurz anterior des Knotens.

3.1.3.1 Ultrastrukturelle Untersuchung der NMC

Die Struktur der Matrix, mit denen die NMC gefüllt waren, erschien bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung (s. 2.3.3) polymorph (Abb. 10B

und E). Die Matrix bestand sowohl aus filamentösen und globulären (Abb. 10D) als auch aus amorphen Anteilen. Die fibrillären Anteile der Matrix (Abb. 10C und F) zeigten eine strukturelle Ähnlichkeit zur Basalmembran des Epiblast (Abb. 10G). In die NMC ragten membranumschlossene, zelluläre Fortsätze hinein. Das darin sichtbare Zytoplasma wies in seiner Struktur Ähnlichkeit zum Zytoplasma der umliegenden Zellen auf. Zudem waren dünne filamentöse Strukturen sichtbar. Mikrotubuli fehlten in den Fortsätzen (Abb. 10F). Die NMC wurden von Zellen umgeben, die zu ihren Nachbarzellen Zell-Zell-Kontakte (Abb. 10C) ausbildeten, in denen sich die Membranen der Zellen sehr dicht aneinander annäherten, ohne jedoch miteinander zu verschmelzen. Intrazelluläre Proteinansammlungen an den Membranen oder Zytoskelettbestandteile, die zu diesen Kontakten hinzogen, waren nicht erkennbar. Allerdings war bei stärkster Vergrößerung elektronendichtes Material zwischen den Membranen der benachbarten Zellen zu finden (Einschub in Abb. 10C). Die Kontaktstrukturen waren um die gesamte NCM herum zu finden, die durch die Zellen vollständig begrenzt wurde.



Abb. 10: Nodal microcavities in der Transmissionselektronenmikroskopie. Transversaler Semidünn- (A) und Ultradünnschnitt (B-D) einer NMC im Hensen-Knoten eines Embryos in Stadium HH4+. Die schwarzen Rechtecke in B markieren die in C und D vergrößert dargestellten Bereiche. (C) Vergrößerte Darstellung der unreifen Zell-Zell-Kontakte. Der Einschub zeigt den oberen Kontakt in stärkerer Vergrößerung. (D) Vergrößerte Darstellung der Matrix der NMC. (E) NMC in einem Semidünnschnitt eines Embryos in Stadium HH 7. (F) Vergrößerte Darstellung. Die Position der Vergrößerung ist in E durch einen schwarzen Kasten gekennzeichnet. Der schwarze Pfeilkopf deutet auf einen membranumschlossenen Zellfortsatz. (G) Aufnahme der Basalmembran unter dem Epiblast aus dem in B dargestellten Schnitt. Der Maßstabsbalken in G gibt für A eine Länge von 7,5 μ m, für B und E eine Länge von 1 μ m und für C, D, F und G eine Länge von 250 nm an. Die gekreuzten Pfeile geben die Orientierung im Embryo an: d: dorsal, v: ventral, l: links, r: rechts (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

Im dichten axialen Mesoderm unterhalb der rechten Knotenschulter waren auch in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen NMC zu finden. Es zeigten sich zahlreiche extrazellulär liegende fibrilläre Strukturen. Sie wiesen einen Durchmesser von etwa 20 bis 30 nm auf (Abb. 11). Weitere Räume zwischen den mesodermalen Zellen waren nicht gefüllt. Außerdem zeigten sich zahlreiche zelluläre, mitunter sehr lange Fortsätze, die oft zu Zellen in der Umgebung reichten und mit etwa 150 nm deutlich dicker waren als die fibrillären Moleküle. An manchen Stellen war die Keimscheibe so gebrochen, dass die Ultrastruktur der Basalmembran erkennbar wurde. Diese zeigte ein Netz aus vielen Filamenten, das der Struktur der Matrix in den NMC ähnelt (Abb. 11D).



Abb. 11: Nodal microcavity in der Rasterelektronenmikroskopie. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Embryos in Stadium HH 4-, der im Knotenbereich gebrochen wurde. (A) Übersichtsaufnahme. (B) Detailaufnahme des zellulären Kontexts. (C) Detailaufnahme der Matrix in der NMC. Die schwarzen Pfeilköpfe deuten auf einen Zellfortsatz. Die schwarzen Rechtecke in A und B markieren jeweils den im nächsten Bildteil vergrößert dargestellten Bereich. (D) Aufnahme der Basalmembran unter dem Epiblast in einem peripheren Bereich desselben Embryos. Der Maßstabsbalken in D entspricht für A einer Länge von 20 µm, für B und D 4,5 µm und für C 0,6 µm. Die gekreuzten Pfeile in D geben die Orientierung im Embryo an: d: dorsal, v: ventral, l: links, r: rechts (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

3.1.3.2 Molekulare Charakteristik der NMC

Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Keimscheiben in den Stadien HH 4 und HH 5 gegen Moleküle der extrazellulären Matrix und insbesondere gegen verschiedene Bestandteile der Basalmembran zeigten teilweise bestimmte Färbemuster (Abb. 12).



Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung gegen Fibronektin, Perlecan und Fibrillin-2 an ganzen Embryonen. (A) Färbung mit einem Antikörper gegen das Protein der extrazellulären Matrix Fibronektin an einem Embryo des Stadiums HH 4+. (A[•]) Gegenfärbung mit Phalloidin. (A") Übereinanderlagerung der Bilder A und A'. (B) Färbung mit einem Antikörper gegen das Basalmembranprotein Perlecan an einem Embryo im Stadium HH 4+. (B') Gegenfärbung mit Phalloidin. (B") Übereinanderlagerung der Bilder B und B'. (C) Färbung mit einem Antikörper gegen das Basalmembranprotein Perlecan in einem Embryo im Stadium HH 5. (C) Gegenfärbung mit Phalloidin. $(C^{\prime\prime})$ Übereinanderlagerung der Bilder C und C^c. (D) Färbung mit einem Antikörper gegen das extrazellulär Matrix Protein Fibrillin-2 in einem Embryo des Stadiums HH 4+. (D') Gegenfärbung mit Phalloidin. (D") Übereinanderlagerung der Bilder D und D'. Die weißen Linien zeigen die Ausrichtung der Primitivrinne, an deren Enden sich jeweils die Primitivgrube befindet. Der Maßstabsbalken in D" zeigt eine Länge von 100 µm an. Die gekreuzten Pfeile in A" geben die Orientierung der Keimscheibe an: a: anterior, p: posterior, l: links, r: rechts (Abbildungsteile A-A" und B-B" verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

Die Färbung mit dem Antikörper VA1(3)-s (Developmental Studies Hybridoma Bank DSHB, Iowa) gegen Fibronektin als Bestandteil der Basalmembran ergab eine fleckförmige starke Färbung. Mithilfe der Aktinfärbung mit Phalloidin zur Visualisierung von Zellgrenzen ließen sich die stark gefärbten Bereiche unmittelbar vor und neben der Primitivgrube, also im Hensen-Knoten lokalisieren (Abb. 12A). Das Signal des Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpers, das die Bindung des Primärantikörpers anzeigte, umrahmte die Primitivgrube anterior. Die Primitivgrube selbst war nur vom Phalloidin gefärbt und zeigte ein besonders starkes Fluoreszenzsignal, das nicht mit dem Fluoreszenzsignal des Fibronektins überlappt (Abb. 12A"). Posterior des Hensen-Knotens waren kleinere, fleckförmig gefärbte Bereiche erkennbar. Das umliegende Gewebe war ebenfalls schwach gefärbt und zeigte ein netzartiges Muster.

Die Färbung mit dem Antikörper 5C9-s (DSHB), der gegen den Basalmembranbestandteil Perlecan gerichtet war, hat ebenfalls ein fleckförmiges Muster ergeben. In Stadium HH 4+ gruppierte sich die Färbung um die Primitivgrube und auch um die Primitivrinne, war also im gesamten Verlauf des Primitivstreifens zu erkennen. Im umliegenden Gewebe war ebenfalls eine sehr schwache, aber gleichmäßige Färbung zu erkennen. Stärkere Färbungen ergaben sich im Primitivstreifen an der Stelle, an der die Basalmembran unterbrochen wurde. In der Primitivrinne war die schwache Färbung, die im umliegenden Epiblast auftrat, nicht zu sehen. In Stadium HH 5 war die ebenfalls fleckförmige Färbung vor allem in der rechten Knotenschulter konzentriert. In der Phalloidinfärbung war der Knick zwischen Primitivgrube und Primitivgrube. In der weiter posterior liegenden linken Knotenschulter war eine schwache, diffuse Färbung zu erkennen, die der Färbung des umliegenden Gewebes entsprach. Auch im Primitivstreifen ergab sich eine fleckförmige Färbung, die sich mehr auf der rechten Seite befand. Im umliegenden Gewebe war die Färbung ebenfalls schwach vorhanden, allerdings nicht so gleichmäßig verteilt wie in Stadium HH 4+, sondern an einigen Stellen eher wolkig aufgetrieben (Abb. 12B bis C").

Die Färbung mit dem Antikörper JB3-s (DSHB), der gegen Fibrillin-2 gerichtet war, ergab ebenfalls eine fleckförmige Färbung im Bereich des gesamten Primitivstreifens. Die Flecken waren zahlreicher und dichter zusammenliegend als in der Perlecanfärbung. Außerdem waren zahlreiche gefärbte Bereiche außerhalb der axialen Strukturen des Embryos erkennbar. Im Hensen-Knoten zeigte sich die fleckförmige Färbung besonders dicht und auch in dem Bereich, der sich anterior des Knotens befand, war eine solche Färbung zu erkennen (Abb12. D-D"). Das Muster wies eine bilaterale Symmetrie auf.

Die Färbung mit einem Antikörper gegen Chondroitinsulfat als Grundsubstanzmolekül ergab eine schwache, gleichmäßige Färbung der gesamten Keimscheibe (keine Abbildung).

Die Technovit®-Schnitte (s. 2.3.1) von immunhistochemisch gefärbten Embryonen (s. 2.3.7) zeigten die Verteilung der gefärbten Strukturen bezogen auf die Schichten der Keimblätter des Embryos. Außerdem war die Lokalisation der Färbung auf subzellulärer Ebene möglich. Bei der Färbung gegen Fibronektin hat sich ein spezifisches Muster ergeben (Abb. 13). Die Färbung gegen Laminin ergab eine gleichmäßige Färbung in allen Schichten des Embryos (keine Abbildung).



Abb. 13: Immunhistochemische Färbung gegen Fibronektin an einer ganzen Keimscheibe. (A) Dunkelfeldaufnahme eines gefärbten Embryos in Stadium HH 5-. Die Striche geben die Höhen der Schnitte in B und C an; (B) Technovit®-Schnitt durch denselben Embryo im vorderen Teil des Knotens. (C) Schnitt durch den Embryo weiter posterior im Knoten. Der Maßstabsbalken in C gibt eine Länge von 25 µm für B und C an (Abbildung verändert nach Pieper et al. 2019; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

Wie auch in der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper gegen Fibronektin (Abb. A und A") zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung ebenfalls eine starke Farbreaktion im vorderen Knotenbereich in den Stadien HH 4 und HH 5-. In der Area pellucida war eine gleichmäßige Braunfärbung zu sehen. Diese fehlte in der Mitte des Primitivstreifens und in einem großen Bereich in der Mitte des Hensen-Knotens. In Technovit®-Schnitten war an der Grenze zwischen dem Epiblast und dem darunter liegendem Mesoderm in der ganzen Keimscheibe rechts und links des Primitivstreifens eine feine braun gefärbte Linie zu erkennen. An der Position des Primitivstreifens fehlte diese Färbung vollständig. Dies entspricht der Position und Verteilung der Basalmembran des Epiblast. Im Hensen-Knoten traten größere braun gefärbte Bereiche auf. In den am weitesten anterior gelegenen Schnitten, in denen diese Färbung auftrat, war sie sehr breit und zeigte eine größere kraniokaudale Ausdehnung als die umliegende Basalmembranfärbung. An dieser Stelle war die Basalmembran in der Mittellinie bereits unterbrochen. Hier begann der Knoten. Bezogen auf den Epiblast und das Mesoderm lag dieser stark gefärbte Bereich genau auf der Höhe, auf der in der Umgebung der Epiblast und das Mesoderm durch die Basalmembran getrennt waren. Dabei erinnerte er an die Position und die Ausdehnung der NMC in den Semidünnschnitten in Stadium HH 4 (Abb. 13B, Vgl. Abb. 8B"). In weiter posterior gelegenen Schnitten traten kleinere, fleckförmig gefärbte Stellen in der rechten

Knotenschulter auf (Abb. 13C). Auch in diesen Schnitten wölbte sich die rechte Knotenschulter nach dorsal.

3.1.4 Expressionsmuster des Mastergens für motile Zilien Foxj1

Die Übersichtsaufnahmen von Hühnerembryonen, die in der *In-situ*-Hybridisierung mit einer cRNA-Sonde gegen das Mastergen für motile Zilien *Foxj1* gefärbt wurden, zeigten ein bestimmtes Färbemuster Abb. 14).



Abb. 14: *Foxj1*-Expression in Embryonen der Stadien HH 3+ bis HH 5. (A-E) Übersichtsaufnahmen von Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach *Insitu*-Hybridisierung mit der cRNA-Sonde cFoxj1. Die Stadien sind im jeweiligen Bildabschnitt angegeben. (F-N) Schnitte durch die in C, D und E abgebildeten Embryonen. Die Sterne in I, K und L markieren die *Chorda dorsalis*. Die schwarzen Pfeilköpfe markieren den Hensen-Knoten. Der Maßstabsbalken in N gibt eine Länge von 775 µm für die Aufsichten und eine Länge von 100 µm für die Schnitte an.

Die Übersichtsaufnahmen der gefärbten Keimscheiben zeigten in den Stadien HH 3+ und HH 4 eine gleichmäßig verteilte Färbung in der *Area pellucida*. Lediglich die Primitivrinne blieb in beiden Stadien ausgespart (Abb. 14A und B). Ab Stadium HH 4+ kam zu diesem Muster noch eine starke Färbung unmittelbar anterior des Hensen-Knotens in der Mittellinie hinzu. Diese stabförmige Färbung wurde mit der fortschreitenden Entwicklung des Embryos länger (Abb. 14C-E). Die Primitivrinne blieb weiterhin ungefärbt.

In transversalen Technovit®-Schnitten der Embryonen nach der *In-situ*-Hybridisierung gelang die Zuordnung der Färbung zu den einzelnen Keimblättern. Der Embryo in Stadium HH 4+ war leicht überfärbt. In den Schnitten war eine starke Färbung des Epiblast zu erkennen. In der Mittellinie war die Färbung etwas stärker als im umliegenden Epiblast (Abb. 14F und G). In Stadium HH 5- war zu sehen, dass sich die Färbung auf den Epiblast beschränkte. Auch hier war die stärker gefärbte Mittellinie anterior des Knotens erkennbar (Abb. 14H). Die *Chorda dorsalis* blieb vollständig ungefärbt. Das umliegende Mesoderm zeigte eine schwache Färbung (Abb. 14I). Der Hensen-Knoten war ebenso ungefärbt wie die auswachsende *Chorda dorsalis* (Abb. 14J). Das gleiche Muster mit der ungefärbten *Chorda dorsalis* und dem Hensen-Knoten fand sich auch in Stadium HH 5 (Abb. 14L bis N). Die Färbung in der Mittellinie anterior des Knotens entsprach der Position der zukünftigen Bodenplatte des sich bildenden Neuralrohrs. Der knotennahe Anteil der zukünftigen Bodenplatte zeigte basal allerdings keine Färbung (Abb. 14L).

3.1.5 Expressionsmuster des Rechts-Links-Dyneins

Die Übersichtsaufnahmen der in der *In-situ*-Hybridisierung gegen Rechts-Links-DyneinmRNA gefärbten Embryonen zeigten in Stadium HH 3+ eine Färbung in der gesamten Keimscheibe. Die *Area pellucida* war bis auf den Primitivstreifen vollständig gefärbt. In der *Area opaca* war ebenfalls eine Färbung erkennbar (Abb. 15A). Ab Stadium HH 5 waren nur noch Bereiche in der *Area pellucida* gefärbt. In den Stadien HH 5 und HH 6 zeigte sich ein gefärbter Ring entlang des Randes der *Area pellucida*. Der Ring wurde von dem ungefärbten Primitivstreifen posterior unterbrochen. Die Region innerhalb des gefärbten Rings war ungefärbt (Abb. 15b und C). In Stadium HH 7 war der Ring insbesondere im anterioren Bereich schmaler geworden. Zudem zeigte sich eine Farbreaktion in der Mittellinie anterior des Hensen-Knotens (Abb. 15D). In dem Technovit®-Schnitt durch diesen Bereich ist erkennbar, dass diese Färbung auf eine Farbreaktion in den parachordalen Zellen des Mesoderm zurückzuführen war (Abb. 15F). Die Färbung, die den gefärbten Ring am Rand der *Area pellucida* ausmachte, war im Epiblast bzw. Ektoderm lokalisiert. Das Mesoderm blieb weitgehend ungefärbt (Abb. 15E bis G).



Abb. 15: *Rechts-Links-Dynein*-Expression in den Stadien HH 3+ bis HH 8-. (A-D) Übersichtsaufnahmen von Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach *Insitu*-Hybridisierung mit der cRNA-Sonde cLRD. Die Stadien sind im jeweiligen Bildabschnitt angegeben. Die geschwungene Klammer in B hebt den gefärbten Bereich hervor. Der Einschub in D zeigt die Region der auswachsenden *Chorda dorsalis* und des Hensen-Knotens. Die Position in der Übersicht ist mit einem schwarzen Rechteck gekennzeichnet. Die Höhe der in E, F und G gezeigten Schnitte ist in D angegeben. Die Pfeilköpfe in A-D zeigen die Position des Knotens an. (E) Technovit®-Schnitt durch den Embryo in Stadium HH 7 auf Höhe der Neuralfalten. (F) Schnitt auf Höhe der *Chorda dorsalis*. Die Pfeile zeigen auf die stärker gefärbten rechten und linken Bereiche entlang der *Chorda dorsalis*. (G) Schnitt im Bereich des posterioren Anteils des Primitivstreifens. Der Maßstabsbalken in G gibt eine Länge von 1000 µm für A-D, eine Länge von 360 µm für den Einschub in D, eine Länge von 115 µm für E und G und eine Länge von 38 µm für F an.

3.2 Komponenten der Ionenfluss-Hypothese

In diesem zweiten Ergebnisteil wird zunächst die Herstellung der Sonde für die α -Untereinheit und danach das Expressionsmuster der ATP4a und der ATP4b vorgestellt. Nach der Beschreibung der Membrandepolarisationsmuster an kultivierten Embryonen werden die Ergebnisse der Expressionsanalyse für *Nodal* als frühem Marker für die molekulare Symmetriebrechung nach Inhibition der ATP4 dargestellt.

3.2.1 Klonierung der ATP4a-Sonde

Die PCR (s. 2.2.3) mit den Primern ATP4aGgForT und ATP4aGgRevT (Biomers, Ulm) mit der cDNA, die aus Embryonen des Stadiums HH 10 generiert wurde (s. 2.2.1, 2.2.2), zeigte in der Agarosegelektrophorese (s. 2.2.4) in beiden Reaktionsansätzen einzelne, scharf abgrenzbare Banden (Abb. 16).



Abb. 16: ATP4a-PCR. Agarosegelektrophorese der PCR-Produkte der ATP4a-PCR. Aufgetragen sind der GeneRuler 100bp Plus und die PCR-Ansätze, die in Duplikaten angefertigt wurden. Die Zahlen neben den Banden des Markers geben die Fragmentlänge in Anzahl der Basenpaare an. Das PCR-Produkt hat eine Größe von etwa 700 bp.

Die erwartete Fragmentlänge betrug 711 bp. Die Länge des PCR-Produkts stimmte damit mit der erwarteten Fragmentlänge überein. Nach dem Einfügen in ein Plasmid und Transformation in Bakterien wurden zwei Plasmidproben sequenziert, von denen eine mit der erwarteten Sequenz zu 99% übereinstimmte (s. Abb. im Anhang). Die nicht homologen Anteile zu Beginn des Sequenzierungsergebnisses entstammten dem zur Klonierung verwendeten Vektor. Dieser Klon wurde aufgrund der hohen Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz als Ausgangsmaterial zur Synthese der *sense-* und *antisense-* cRNA-Sonden für die ATP4a verwendet (s. 2.2.13).

Die Agarosegelektrophorese der synthetisierten ATP4a-Sonde zeigte für beide Reaktionsansätze mit den Polymerasen Sp6 und T7 jeweils klar begrenzte Banden, sodass beide Sonden für die *In-situ*-Hybridisierung verwendet werden konnten (Abb. 17).



Abb. 17: Agarosegelektrophorese der ATP4a-Sonde nach *In-vitro*-Transkription. Aufgetragen sind der Größenmarker GeneRuler 100 bp Plus, in Tasche 1 das Produkt der Transkription mit der T7-Polymerase und in Tasche 2 das Produkt der Transkription mit der Sp6-Polymerase. Die Zahlen neben dem Größenmarker geben die Fragmentlänge in bp an.

3.2.2 Expressionsmuster der ATP4

Die klonierte ATP4a-Sonde gegen die mRNA der ATP4 α -Untereinheit mit dem Reaktionsansatz der T7-Polymerase ergab eine Färbung in der *In-situ*-Hybridisierung (Abb. 18A-G und I-O). Die Embryonen, bei denen der Sp6-Ansatz verwendet wurde, blieben vollständig ungefärbt.

Außerdem wurden Embryonen in den Stadien HH 3+ bis HH 5- mit einer Sonde gegen mRNA der ATP4 β-Untereinheit gefärbt (Abb. 18).



Abb. 18: *ATP4*-Expression in Embryonen in den Stadien HH 1 bis 5 und HH 10. (A-G) Übersichtsaufnahmen von Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien nach *In-situ*-Hybridisierung mit der cRNA-Sonde ATP4a_Gg. (H) Übersichtsaufnahme eines Embryos nach der *In-situ*-Hybridisierung mit der cRNA-Sonde ATP4b. Die Stadien sind im jeweiligen Bildabschnitt angegeben. In den Abbildungsteilen D, E und F sind die Höhen der in I-O abgebildeten Schnitte mit schwarzen Strichen markiert. (I-O) Transversale Technovit®-Schnitte. Die Sterne in D, I und J markieren einen stärker gefärbten Bereich am anterioren Rand der *Area pellucida*. Die geschwungene Klammer in F zeigt einen nach posterior geöffneten hufeisenförmigen, stärker gefärbten Bereich. Die eckige Klammer in G zeigt auf einen stärker gefärbten Bereich, der der Darmpforte entspricht. Die Pfeilköpfe zeigen auf den Hensen-Knoten. Der Maßstabsbalken in O gibt eine Länge von 1000 µm für A-H und eine Länge von 200 µm für I-O an.

In den Stadien HH 1 und HH 2 waren sowohl die Area pellucida als auch die Area opaca gleichmäßig gefärbt (Abb. 18A und B). In Stadium HH 2 war der Primitivstreifen erkennbar und zeigte eine kräftigere Färbung als das umliegende Gewebe (Abb. 18B). In Stadium HH 3+ war die Färbung des extraembryonalen Gewebes, also die Färbung der Area opaca, schwächer. Die Primitivrinne war weniger stark gefärbt als die Umgebung (Abb. 18C). In den Stadien HH4 - HH 5 beschränkte sich die extraembryonale Färbung auf einige wenige Flecken ("Pfeffer und Salz"-Muster). Eine stärkere, bogenförmige Anfärbung war am anterioren Rand der Area pellucida erkennbar. Der Primitivstreifen und der Hensen-Knoten waren ab Stadium HH 4 im Gegensatz zum umliegenden Gewebe kaum gefärbt (Abb. 18D-E). In Stadium HH 5 war ein hufeisenförmiger, mit seiner Öffnung nach posterior gerichteter, stärker gefärbter Bereich sichtbar (Abb. 18F). In Stadium HH 10 war ein Bereich unmittelbar kaudal des sich bildenden Herzschlauchs stärker gefärbt, der mit der Position der Darmpforte übereinstimmte. Außerdem war in diesem Stadium im bereits geschlossenen Neuralrohr und in den Hohlräumen der Hirnbläschen viel Farbstoff ausgefallen (Abb. 18G). In den Technovit®-Schnitten der gefärbten Embryonen war erkennbar, dass alle drei Zellschichten etwa gleichmäßig gefärbt waren. Die bogenförmige Struktur, die anterior an der Grenze zwischen Area pellucida und dem extraembryonalen Gewebe lag, zeigte auch in den Schnitten in den Stadien HH 4 und HH 4+ eine stärkere Färbung als die anderen Gewebe. Dies stimmt mit der Position mit dem amniocardiac vesicle überein. In diesen Strukturen waren einzelne große runde gefärbte Zellen erkennbar (Abb. 18I und J). In den axialen Strukturen, dem Hensen-Knoten, dem Primitivstreifen und der auswachsenden Chorda dorsalis hat keine Farbreaktion stattgefunden, sodass an dieser Stelle keine Färbung sichtbar war (Abb. 18J-O). In den Schnitten durch den Embryo in Stadium HH 4+ war die Färbung des Epiblast vor allem in den basalen Teilen der Zellen lokalisiert. In Stadium HH 5 waren die Zellen hingegen gleichmäßig gefärbt.

Die Färbung mit einer zweiten Sonde gegen die α -Untereinheit der ATP4, die bestellt wurde (GeneCust, Luxemburg), ergab keine Färbung an den verwendeten Keimscheiben.

Die Expression der ATP4b (Abb. 18H) war in allen Stadien gleichmäßig in der *Area pellucida* verteilt. Extraembryonales Gewebe in der *Area opaca* wurde am Übergang zur *Area pellucida* gefärbt. Der Primitivstreifen war hier ebenfalls gefärbt.

Die Validierung der cRNA-Sonde ATP4a erfolgte durch die Färbung von Organpaketen von Hühnerembryonen in Stadium HH 32. (Abb. 19). Diese Proben zeigten eine starke Anfärbung, die sich an einem isolierten Magenpräparat (Abb. 19C) der Anlage des Drüsenmagens zuordnen ließ. Die Färbung zeigte sich hier in stark gefärbten Flecken, die von weniger stark gefärbten Bereichen umgeben waren. Die Anlage des Muskelmagens und die sich daran anschließende Anlage des Zwölffingerdarms blieben ungefärbt. Auch das Neuralrohr und die Nierenanlagen waren angefärbt. Die beiden Lappen der sich entwickelnden Leber zeigten keine Färbung. Die Farbentwicklung in diesen Präparaten war nach 3 Tagen bereits sehr stark. Die Keimscheiben der niedrigeren Stadien wurden in der Regel eine Woche lang in der Farblösung inkubiert.


Abb. 19: *ATP4a*-Expression in Stadium HH 32. Organe des Oberbauchs eines Hühnerembryos des Stadiums HH 32 nach *In-situ*-Hybridisierung mit der cRNA-Sonde ATP4a_Gg. (A) Lateralansicht von links. (B) Ansicht von kaudal auf dasselbe Präparat. (C) Ansicht von kaudal auf einen isolierten Magen eines weiteren Embryos. Einzelne Organanlagen sind markiert: N: Neuralrohr, RL: rechter Leberlappen, LL: linker Leberlappen, DM: Drüsenmagen, MM: Muskelmagen, U: Urniere, Z: Zwölffingerdarm. Der Maßstabsbalken in C zeigt eine Länge von 1 mm für A und B und eine Länge von 1,8 mm für C. Die gekreuzten Pfeile neben den einzelnen Abbildungen zeigen die Orientierung des Präparates an, B und C sind gleich orientiert: a: anterior, p: posterior, v: ventral, d: dorsal, l: links, r: rechts.

3.2.3 Membrandepolarisationsmuster in den Stadien HH 3+ bis HH 4+

Die Muster der Membrandepolarisationsmessung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3) an Embryonen der Stadien HH 3+ bis HH 4+ in Kultur (s. 2.1.4) sind in Abb. 20 dargestellt.



Abb. 20: Membrandepolarisationsmuster in den Stadien HH 3+ bis HH 4+. Aufsichten auf Embryonen in Kultur, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3) behandelt wurden. (A–C) Embryonen des Stadiums HH 3+. (D–F) Embryonen des Stadiums HH 4. (G–I) Embryonen des Stadiums HH 4+. (A, D, G) Stärkere Depolarisation auf der linken Seite. (B, E, H) Symmetrische Depolarisationsmuster. (C, F, I) Stärkere Depolarisation auf der rechten Seite. Die Stadien sind an jedem Abbildungsteil vermerkt. Die roten Linien geben die Ausrichtung des jeweiligen Primitivstreifens an. Die Vorderenden der roten Linien liegen auf Höhe des anterioren Endes des Primitivstreifens in Stadium HH 3+ und auf Höhe des Hensen-Knotens in den Stadien HH 4 und HH 4+. Die Zahlen (N=...) geben die Anzahl der Embryonen an, bei denen bezüglich der Seite der Depolarisation im selben Stadium ein ähnliches Muster gefunden wurde. Der Maßstabsbalken in I gibt eine Länge von 400 µm an.

Die DiBAC4(3)-Färbung erzeugte in den drei untersuchten Stadien uneinheitliche Färbemuster, die jeweils zu einer von drei Kategorien zugeordnet wurden (Abb. 20). Dabei variierten die Stellen im Embryo, an denen das Fluoreszenzsignal am stärksten war. Bei manchen Embryonen zeigte sich eine Asymmetrie direkt neben dem Knoten. Bei vielen Embryonen war allerdings fast eine gesamte Hälfte der Keimscheibe stärker gefärbt als die andere Hälfte. Unter besonderer Berücksichtigung der Bereiche auf Höhe des Hensen-Knotens wurde bei der überwiegenden Anzahl der untersuchten Embryonen (n=21) ein symmetrisches Muster gefunden (Abb. 20B, E, H). Unter den Embryonen, die ein asymmetrisches Depolarisationsmuster zeigten, waren die Färbungen entweder auf der rechten (Abb. 20C, F, I) oder auf der linken Seite stärker. Die Kontrollembryonen, die nur mit einer DMSO-Lösung inkubiert wurden, zeigten in der *Area opaca* eine Fluoreszenz. Ein Fluoreszenzsignal in der *Area pellucida* war nicht zu detektieren.

3.2.4 *Nodal*-Expression nach pharmakologischer Unterdrückung der ATP4-Aktivität mit SCH28080

Nach der pharmakologischen Unterdrückung der H⁺/K⁺-ATPase durch zweimalige im Abstand von jeweils 2 h vorgenommen Applikation mit 200 μ M oder 400 μ M SCH28080 und Kultur bis mindestens Stadium HH 5- ergaben sich die folgenden Expressionsmuster von *Nodal* (s. 2.2.14):

Von 37 Embryonen, die mit SCH28080 in einer Konzentration von 200 µM behandelt wurden, erreichten 31 Embryonen ein Stadium, in dem Nodal mindestens in der paraxialen Domäne asymmetrisch exprimiert wird, also wenigstens Stadium HH 5-/5. Die übrigen 6 Embryonen wurden bereits in Stadium HH 4+ oder im sehr frühen Stadium HH 5- fixiert. In diesen Embryonen zeigte Nodal seine Expression im Primitivstreifen oder gar keine Expression. Unter den Embryonen, die eine asymmetrische Nodal-Expression aufwiesen, war diese ohne Ausnahme auf der linken Seite des Embryos entweder in der paraxialen Domäne oder bereits im Seitenplattenmesoderm lokalisiert. Es konnte weder ein Ausbleiben, noch eine beidseitige Nodal-Expression beobachtet werden (Abb. 21 und Tabelle 1). Von 17 Embryonen, die mit SCH28080 in einer Konzentration von 400 µM behandelt wurden, zeigten alle Embryonen ab dem entsprechenden Stadium eine Nodal-Expression in der paraxialen Domäne oder im Seitenplattenmesoderm auf der linken Seite. In Tabelle 1 ist die Anzahl der behandelten Embryonen nach ihrem Stadium bei der Behandlung und der gewählten SCH28080-Konzentration dargestellt. Solche Embryonen, die in einem zu frühen Stadium fixiert wurden, sodass noch keine asymmetrische Nodal-Expression auftrat, sind nicht aufgeführt. Nach der Behandlung in Stadium HH 3+ betraf dies fünf Embryonen, nach der Behandlung in Stadium HH 4 einen Embryo. Bei der Konzentration von 400 µM wurde jeweils ein Embryo nach der Behandlung in den Stadien HH 1, HH 3+ und HH 4+ fixiert. Diese zeigten das noch bis Stadium HH 4+ vorhandene symmetrische Nodal-Expressionsmuster. Die vier zu Beginn der Versuchsreihen parallel mit DMSO 1:75 und 1:150 in PBS als Negativkontrollen behandelten Embryonen zeigten ausnahmslos eine Nodal-Expression auf der linken Seite.



Abb. 21: Nodal-Expression nach Behandlung mit SCH28080. Aufnahmen von Hühnerembryonen nach der *In-situ*-Hybridisierung für Nodal-mRNA in den Stadien HH 5 und 6. Alle dargestellten Embryonen wurden mit SCH28080 in einer Konzentration von 200 μ M behandelt. (A) Behandlung in Stadium HH 3, Fixierung in HH 5. (B) Behandlung in Stadium HH 3+, Fixierung in HH 5. (C) Behandlung in Stadium HH 4, Fixierung in Stadium HH 6. Die schwarzen Pfeilköpfe weisen auf die Position des Hensen-Knotens. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 500 μ m an.

	20	$200 \mu M$		$400 \ \mu M$	
Stadium bei Behandlung	linksseitige Expression	rechtsseitige/ symmetrische Expression	Linksseitige Expression	rechtsseitige/ symmetrische Expression	
1	-	-	1		
2	1	-	1	-	
3	4	-	1	-	
3+	9	-	7	-	
4	9	-	3	-	
4+	2	-	1	-	
5-	4	-	-	-	
5	2	_	_	_	

Anzahl der Embryonen, die nach der Behandlung mit SCH28080 in zwei verschiedenen Konzentrationen in der *In-situ*-Hybridisierung gegen Nodal-mRNA gefärbt wurden, nach Stadien bei der Behandlung und Expressionsmuster sortiert. Die Zeilen mit den Embryonen, die in den entscheidenden Stadien HH 3 bis HH 4 behandelt wurden, sind hervorgehoben.

3.3 Abhängigkeit der Foxj1-Expression von ATP4

In diesem Teil der Ergebnisse wird die Expression von *Foxj1* nach der ATP4-Unterdrückung und nach Behandlung mit zwei verschiedenen Inhibitoren des Wnt-Signalwegs beschrieben.

3.3.1 Foxj1-Expression nach Behandlung mit SCH28080

Bei elf Embryonen, die mit SCH28080 in einer Konzentration von 200 µM behandelt wurden, und 15 Embryonen, die mit SCH28080 in einer Konzentration von 400 µM behandelt wurden, zeigte sich anschließend in der *In-situ*-Hybridisierung gegen Foxj1-mRNA eine gleichmäßige Färbung der Keimscheibe unter Aussparung des Primitivstreifens. Anterior des Hensen-Knotens zeigte sich ab Stadium HH 4+ eine stärkere Färbung in der Mittellinie. Damit stimmte das Muster mit dem Expressionsmuster der unbehandelten Embryonen überein (keine Abbildung; Vgl. 3.1.4,). Aus diesem Grund wurde auf die Durchführung von Negativkontrollen verzichtet. Tabelle 2 gibt Auskunft über die Anzahl der behandelten und gefärbten Embryonen, nach Stadium bei der Behandlung sortiert.

Stadium bei Behandlung	200µM	400µM
3	1	2
3+	6	4
4	3	6
4+	1	3

Tabelle 2: Foxj1-Expression nach Behandlung mit SCH28080.

Anzahl der Embryonen, die nach Behandlung mit SCH28080 in zwei verschiedenen Konzentrationen in der *In-situ*-Hybridisierung gegen Foxj1-mRNA gefärbt wurden, nach Stadien bei der Behandlung sortiert.

3.3.2 Nodal-Expression nach Wnt-Inhibition mit LGK-974 und Wnt-5C9

Insgesamt wurden nur wenige Embryonen explorativ mit den verschiedenen Wnt-Inhibitoren behandelt (Tabelle 3).

_		
Stadium bei Behandlung	LGK-974	Wnt-5C9
4	4	3
4+	3	4

5-

Anzahl der Embryonen, die nach der Behandlung mit dem jeweiligen Wnt-Inhibitor in der *In-situ*-Hybridisierung mit der cRNA-Sonde cNodal gefärbt wurden.

1

2

Alle Embryonen, die mit den Wnt-Inhibitoren behandelt wurden, zeigten eine *Nodal*-Expression auf der linken Seite. In den Embryonen, die in frühen Stadien fixiert wurden, zeigte sich die Färbung in der paraxialen knotennahen *Nodal*-Expressions-Domäne (Abb. 22A und B). In späten Stadien färbte sich auch das Seitenplattenmesoderm auf der linken Seite stark an (Abb. 22C und D). Die Expressionsmuster entsprachen dem Normalbefund, sodass hier auf die Durchführung von Negativkontrollen verzichtet wurde. Die Embryonen zeigten über die normale Genexpression hinaus allerdings morphologische Defekte wie eine deutliche Verbreiterung der Darmpforte. Außerdem sind die Embryonen kleiner geblieben als unbehandelte Embryonen.



Abb. 22: *Nodal*-Expression nach Wnt-Inhibition. (A) *Nodal*-Expression in Stadium HH 5- nach Behandlung mit LGK974 in Stadium HH 4. (B) *Nodal*-Expression in Stadium HH 6 nach Behandlung mit LGK974 in Stadium HH 4+. (C) *Nodal*-Expression in Stadium HH 8+ nach Behandlung mit Wnt5C9 in Stadium HH 4. (D) *Nodal*-Expression in Stadium HH 8+ nach Behandlung mit Wnt5C9 in Stadium HH 4+. Die Pfeilköpfe in A und B weisen auf die Position des Hensen-Knotens. Der Maßstabsbalken in D gibt eine Länge von 500 μm an.

3.4 Shh-Inhibition mit Cyclopamin

Die zur Unterdrückung des *shh*-Signalwegs in Stadium HH 4 mit Cyclopamin behandelten Embryonen (s. 2.1.3) zeigten eine vollständige Unterdrückung der *Nodal*-Expression in Stadium HH 5. In der *In-situ*-Hybridisierung wurde trotz ausreichend langer Inkubation in der Färbelösung in allen 14 behandelten Embryonen keine mRNA nachgewiesen (Abb. 23B). In acht von neun Kontrollembryonen, die lediglich in Kultur genommen und mit 0,1% Ethanollösung in PBS behandelt wurden, zeigte sich die erwartete linksseitige *Nodal*-Expression (Abb. 23A). Braychyury als Marker für mesodermale Zellen zeigte in allen zehn mit Cyclopamin behandelten Embryonen ein normales Expressionsmuster (Abb. 23C) im Bereich der mesodermalen Strukturen.



Abb. 23: Nodal- und Brachyury-Expression und Herzschleifenbildung nach Behandlung mit Cyclopamin. (A) Linksseitige Nodal-Expression bei einem unbehandelten Embryo im Stadium HH 5. (B) Unterdrückte Nodal-Expression nach der Behandlung mit Cyclopamin. (C) Brachyury-Expression nach Behandlung mit Cyclopamin. Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen die Position des Hensen-Knotens. (D und E) Herzschleifenbildung nach Behandlung mit Cyclopamin in Stadium HH 5. Das Stadium der abgebildeten Embryonen ist im jeweiligen Bild angegeben. Der Maßstabsbalken in E gibt eine Länge von 500 µm an. (Abbildung verändert nach Otto et al. 2014; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des John Whiley and Sons Verlags).

Eine Behandlung von Embryonen in Stadium HH 5, in dem die asymmetrische Expression von Nodal in seiner paraxialen Domäne bereits etabliert ist, führte in 10 von 13 Embryonen in den Stadien HH 7 und HH 8 zu einem Ausbleiben der *Nodal*-Expression im Seitenplattenmesoderm. In 5 dieser 13 Embryonen war nach der Behandlung zusätzlich die *Nodal*-Expression in der paraxialen *Nodal*-Expressions-Domäne vermindert. In 37 in Stadium HH 5 behandelten Embryonen, die bis Stadium HH 11 kultiviert wurden, zeigten sich die Effekte auf morphologischer Ebene. In 15 dieser Embryonen zeigte sich die Herzschleife auf der rechten Seite (Abb. 23D), wie es in der ungestörten Entwicklung ebenfalls der Fall ist. In 18 Embryonen zeigte die Schleife zur linken Seite (Abb. 23E) und damit genau zur anderen Seite als im Normalfall. Vier Embryonen wiesen zum Zeitpunkt der Fixierung noch einen geraden Herzschlauch auf, der bisher keine Schleife ausgebildet hatte. Alle elf Kontrollembryonen und zehn der zwölf mit 5 µM Cyclopamin behandelten Embryonen zeigten die Herzschleife auf der rechten Seite.

4 Diskussion

In dieser Diskussion werden zunächst kurz die Ergebnisse zusammengefasst. Anschließend erfolgt die Diskussion der verwendeten Methoden. Im dritten Teil werden die Aspekte der Zilienstrom-Hypothese diskutiert. Dabei wird insbesondere auf putative Funktionen der NMC eingegangen. Im dann folgenden Teil werden die Aspekte der Ionenfluss-Hypothese diskutiert. Außerdem wird in diesem Teil auf den Zusammenhang zwischen der ATP4 und den Zilien eingegangen. Schlussendlich wird ein Ausblick auf mögliche weitere Untersuchungen und Experimente auf dem Feld der Rechts-Links-Symmetriebrechung in Hühnerembryonen gegeben.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Suche nach inneren Oberflächen und Räumen für die Etablierung eines durch Zilien generierten Flüssigkeitsstroms zur Rechts-Links-Symmetriebrechung zeigten die Zellen des Knotenepiblast in der Licht- und Elektronenmikroskopie eine gekrümmte Form, sodass sie gemeinsam eine Art Kuppel bildeten. Die Knotendrehung, die in der weiter anterioren Lage der rechten Knotenschulter resultierte, konnte im *live-imaging* dargestellt werden. Die von Carpaij 2014 beschriebenen Räume wurden innerhalb der Region des zukünftigen Hensen-Knotens, im Hensen-Knoten selbst und im davon auswachsenden, noch knotennahen Mesoderm gefunden und durch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten von *intraepithelial spaces* zu *nodal microcavities* (NMC) umbenannt. Sie enthielten eine Matrix, die überwiegend aus fibrillären Strukturen bestand. Immunfärbungen zeigten an entsprechenden Stellen ein hohes Vorkommen von Fibronektin. Zilien wurden weder in den NMC noch in anderen inneren Räumen mit Transmissions- oder Rasterelektronenmikroskopie gefunden. Die Analyse der Expression der Gene *Foxj1* und *Rechts-Links-Dynein* ergab keine Hinweise auf die Anwesenheit motiler Zilien im Rechts-Links-Organisator des Huhns.

Unter den Komponenten der Ionenfluss-Hypothese zeigten die beiden Untereinheiten der H^+/K^+ -ATPase ATP4 ein symmetrisches Expressionsmuster. Die Expression der α -Untereinheit sparte den Primitivstreifen und den Hensen-Knoten aus. Bei der Färbung für Membrandepolarisation zeigten viele Embryonen ebenfalls ein symmetrisches Muster. Asymmetrische Muster traten im Bereich des Knotens sowohl rechts- als auch linksseitig auf. Nach der Applikation des ATP4-Inhibitors SCH28080 zeigte das Gen *Nodal* ausnahmslos ein normales Expressionsmuster.

Die Expression von *Foxj1* nach der ATP4-Inhibition zeigte ebenfalls das normale Muster. Auch nach Unterdrückung des Wnt-Signalwegs wurde die linksseitige Expression von *Nodal* gefunden.

Die Unterdrückung von shh mit Cyclopamin ergab ein Ausbleiben der *Nodal*-Expression und eine Randomisierung der Herzschleifenbildung.

4.2 Methodisches

Hühnerembryonen wurden in dieser Arbeit als Organismus gewählt, da bei ihnen der Mechanismus der Rechts-Links-Differenzierung bislang unklar ist und die bisherigen Daten im Gegensatz zu vielen Daten aus anderen Organismen stehen. Das Huhn weist Unterschiede zu den Organismen auf, bei denen die Zilienstrom-Hypothese als gängigste Hypothese zur Rechts-Links-Symmetriebrechung gilt (Blum et al. 2014b). Seine Embryonen sind den menschlichen Embryonen morphologisch ähnlicher als Fisch-, Frosch oder Mausembryonen. Die Embryonen des Zebrafisches und des Krallenfrosches *Xenopus* zeigen eine sphärische Morphologie. Die Embryonen der Maus sind tonnenförmig gebaut. Die Embryonen von Mensch und Huhn hingegen bilden eine flache Keimscheibe, sodass hier schon allein durch die ähnliche Morphologie ähnliche Mechanismen zur Rechts-Links-Symmetriebrechung auftreten könnten. Außerdem ist das Huhn als Modellorganismus bereits gut etabliert (Baer 1828), die Embryonen sind leicht zugänglich und unabhängig von der Jahreszeit in großer Anzahl verfügbar.

Bei der Vorbereitung der Keimscheiben für die Rasterelektronenmikroskopie müssen die Embryonen zunächst fixiert werden. Dadurch kann es zu Schrumpfungen des Gewebes kommen, die zu artifiziellen Spaltbildungen führen könnten. So könnten die Interzellularräume insbesondere im lockeren Zellverband des Mesoderm nach dieser Präparation besonders weit erscheinen. Die Gewebe schrumpfen allerdings bei einer Fixierung mit Glutaraldehyd in der Regel in allen drei Raumdimensionen gleichmäßig (Bastacky et al. 1985). Die Fixierung mit Paraformaldehyd führt bei RT zu einer kaum nennenswerten Schrumpfung (Fox et al. 1985). Die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe führt allerdings zu Schrumpfungen (persönliche Kommunikation mit Hans-Georg Sydow). Beim Brechen der Keimscheiben kann die Richtung der entstehenden Bruchkante nur teilweise gesteuert werden. So mussten mehrere Embryonen gebrochen werden, um Bruchkanten im Knoten zu erhalten. So konnten allerdings auch weitere Strukturen wie das axiale Mesoderm untersucht werden. Die abgebildeten Strukturen wurden als die Oberflächen der Zellen interpretiert, weil die Bruchkanten überwiegend an natürlichen Grenzen entstehen (persönliche Kommunikation mit Hans-Georg Sydow).

Die Anlage der New-Kulturen zur direkten Beobachtung von Gewebeprozessen ist verglichen mit der Anlage der Spannungsring-Kultur aufwendiger. Zusätzlich kann oft beobachtet werden, dass sich die Embryonen in Kultur langsamer entwickeln als im Ei. Dies könnte an der unzureichenden Steuerbarkeit der Spannung der Dottermembran beim Aufbringen des Rings auf das Eiweiß liegen. Diese Tatsache und weitere Faktoren limitieren die Anfertigung von Filmsequenzen in hoher Anzahl. Zunächst stand nur ein Mikroskop mit entsprechendem Inkubator zur Verfügung, um Embryonen in Kultur während ihrer Entwicklung aufzunehmen. Des Weiteren standen die Eier der Membran-GFP-transgenen Hühner nur unregelmäßig zur Verfügung und konnten nur über wenige Tage verwendet werden. Die Entwicklung der Embryonen im Ei kann nach der Ablage der Eier durch deren Lagerung bei 4°C verzögert werden. Sobald die Eier wieder auf 38°C gebracht werden, entwickeln sie sich normal weiter. Beginnt die Kühlung auf 4°C zu spät, entwickeln sich die Embryonen bei der erneuten Bebrütung in der Regel nicht weiter. Zusätzlich sollten die Eier beim Einlegen in den Inkubator möglichst nicht älter als vier Tage sein. In Zusammenschau führt dies dazu, dass nur wenige Filme zur Entwicklung des Knotens hergestellt werden konnten, weshalb die Aussagekraft der Aufnahmen begrenzt ist.

Die Anfertigung von Semidünnschnitten erfordert viel Geschick und Übung. Da die genaue Schnittführung zur Beurteilung der Rechts-Links-Asymmetrie in Transversalschnitten wichtig ist und diese vor allem durch die Einbettung der Embryonen in Araldit® beeinflusst wird, ist dabei mit größter Sorgfalt vorzugehen. Kleine Fehler bei der Ausrichtung während der Einbettung können allerdings beim Schneiden durch die Ausrichtung des Araldit®-Blockes korrigiert werden. Zur Längenbestimmung und zur Verfolgung einzelner Strukturen über mehrere Semidünnschnitte hinweg muss das Vorliegen einer lückenlosen Schnittserie gewährleistet sein. Fehlen einzelne Schnitte, wird die Ausdehnung der nachverfolgten Struktur unterschätzt. Dies kann durch das Freilassen der Stelle, auf den der verlorene Schnitt aufgebracht werden sollte, indiziert werden. So könnte der Verlust einzelner Schnitte bei der Längenbestimmung berücksichtigt werden.

Bei der Herstellung von Ultradünnschnitten werden die Objektträger mit den Semidünnschnitten, aus denen die Ultradünnschnitte hergestellt werden, zerschnitten. Daher stehen die Semidünnschnitte danach nicht mehr zur Verfügung und müssen vor der Weiterverarbeitung lückenlos dokumentiert werden. Beim Anfertigen der Ultradünnschnitte selbst gehen sehr viele Schnitte verloren. Allerdings sind hier keine lückenlosen Schnittserien notwendig, da in den Untersuchungen vor allem die Ultrastruktur untersucht wird und sich diese in unmittelbaren Nachbarschnitten kaum ändert. Alternative Methoden zur ultrastrukturellen Untersuchung von histologischen Präparaten werden zurzeit entwickelt. Beispielsweise können Semidünnschnitte auf Glasobjektträgern nach einer Bedampfung mit Kohlenstoffpartikeln rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden. Die Semidünnschnitte verbleiben dabei auf dem Objektträger, der vollständig intakt bleibt. Außerdem entfällt der aufwendige Schritt, die Ultradünnschnitte zu erstellen. Die entstehenden Bilder reichen in ihrer Auflösung nicht an die der transmissionseletronenmikroskopischen Bilder heran, allerdings können Zellmembranen, Zellkerne und auch andere Zellorganellen wie Mitochondrien erkannt werden. Damit liegt ihre Auflösung im Bereich zwischen der Durchlicht- und der Transmissionselektronenmikroskopie. Nach der Aufnahme der Bilder mit dem Elektronenmikroskop können die Präparate weiterhin mit dem Lichtmikroskop ohne Qualitätseinbußen betrachtet werden (unveröffentlichte Daten).

Zur Klärung der molekularen Bestandteile der Matrix in den NMC wurden Immunfärbungen gegen verschiedene Proteine der Extrazellulären Matrix durchgeführt. Die topographische Korrelation mit der Basalmembran begründete die vornehmliche Verwendung von Antikörpern gegen Proteine der Basalmembran. Zusätzlich wurden auch Färbungen gegen andere Bestandteile der extrazellulären Matrix durchführt. Insbesondere die Färbung gegen Fibronektin ergab in der Immunfluoreszenzfärbung und in der immunhistochemischen Färbung ein spezifisches Muster. Zur Herstellung dieses Antikörpers wurden kultivierte embryonale Gliazellen von Hühnern verwendet. Daher kann von einer Reaktivität mit Fibronektin des Huhns ausgegangen werden (Lefcort et al. 1992). Außerdem wurde die Färbung der Basalmembran im Huhn mit diesem Antikörper bereits gezeigt (Nakaya et al. 2008).

Die immunhistochemische Färbung gegen Laminin ergab lediglich eine unspezifische Farbreaktion. Hier könnte das Färbeprotokoll modifiziert werden, um eine spezifische Färbung zu erreichen. Beispielsweise könnte zum Demaskieren der Antigene, das durch die Inkubation bei 96°C erreicht werden soll, statt des verwendeten Zitratpuffers Tris-Puffer verwendet werden. Das Demaskieren der Antigene wurde zu Beginn der Etablierung des Färbeprotokolls nur bei einigen Keimscheiben durchgeführt. Die Embryonen, bei denen die Demaskierung durchgeführt wurde, zeigten in den Technovit®-Schnitten weniger Artefakte als die nicht demaskierten Proben.

Die Färbung ganzer Keimscheiben mit Antikörpern stellt eine Standardmethode dar. Die Aussagekraft der Übersichtsaufnahmen ist bei den DAB-gefärbten Embryonen allerdings eingeschränkt. Die Lokalisation der Färbung ist an ganzen Keimscheiben in Immunfluoreszenzfärbungen besser möglich. Allerdings lassen sich die Embryonen nach der Immunfluoreszenzfärbung nicht schneiden. Eine subzelluläre Lokalisation der gefärbten Bereiche ist bei diesen Embryonen nur mit Ansätzen wie konfokaler Mikroskopie möglich. Hier ist wiederum die Aussagekraft zur Morphologie nur eingeschränkt möglich, da sich immer nur einzelne Strukturen zeigen, die speziell angefärbt wurden. Ungefärbte Strukturen sind so nicht darstellbar. Daher wurde die immunhistochemische Färbung ganzer Keimscheiben durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die folgende Einbettung der gefärbten Embryonen in Technovit® etabliert. Das DAB, das bei der Farbreaktion ausgefallen ist, blieb während der Einbettung stabil und wurde nicht ausgewaschen. Diese neue Methode ermöglicht nach der Anfertigung von Schnitten die genaue Lokalisation der gefärbten Strukturen auf subzellulärer Ebene. In den Schnitten werden neben den stark gefärbten Strukturen auch zahlreiche morphologische Aspekte sichtbar. So kann die Färbung subzellulären Strukturen wie dem Zellkern oder bestimmten Domänen der Zellmembran zugeordnet werden. Außerdem können die Technovit®-Schnitte beispielsweise mit Hämalaun oder nach Richardson gegengefärbt werden, sodass alle zellulären und extrazellulären Bestandteile des Gewebes dargestellt werden können.

Bei der *In-situ*-Hybridisierung handelt es sich um ein qualitatives Analyseverfahren. Dabei wird das Vorhandensein eines RNA-Moleküls mit einer bestimmten Sequenz in fixierten Geweben oder Zellen nachgewiesen. Dazu werden cRNA-Sonden verwendet, die komplementär zu der nachzuweisenden Sequenz sind. Solche Sonden werden einzeln anhand von bekannten cDNA-Sequenzen für jede zu untersuchende Spezies individuell erstellt und

müssen anschließend für die Färbung etabliert werden. So kann das Ausbleiben einer Farbreaktion bei der Verwendung einer bisher nicht etablierten Sonde nicht mit einem Fehlen der Expression in der untersuchten Probe gleichgesetzt werden. Hingegen kann bei Sonden, die bereits etabliert wurden, ein Ausbleiben der Farbreaktion als Nicht-Expression eines Gens angesehen werden. Bei neu hergestellten Sonden können Fehler beim Färbevorgang, eine nicht passende Sequenz oder weitere, oft unbekannte Faktoren dazu führen, dass schlussendlich keine Farbreaktion stattfindet. Zur Etablierung einer Sonde sollten Gewebeproben gefärbt werden, in denen das jeweils untersuchte Gen sicher exprimiert wird. Für die im Rahmen dieser Arbeit aus isolierter RNA hergestellte Sonde ATP4a_Gg wurden zur Validierung die Organpakete des Oberbauchs von Embryonen in Stadium HH 32 gefärbt. Die Färbung zeigte sich fleckförmig im sich entwickelnden Drüsenmagen, in dem die Magensäure produziert wird (King und McLelland 1979). Die fleckförmige Färbung wurde in gegensätzlicher Weise bei einer In-situ-Hybridisierung mit einer Sonde gegen die mRNA des RNA-bindenden Proteins Hermes gefunden. Die Färbung zeigt im Drüsenmagen fleckförmige Aussparungen (Wilmore et al. 2005). In der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probe ergab sich die erwartete Färbung, sodass die Sonde erfolgreich etabliert und validiert werden konnte. So kann von einer ausreichenden Spezifität der Sonde ausgegangen werden. Außerdem wurden in Embryonen in Stadium HH 10, die zur Extraktion der RNA genutzt wurden, ebenfalls klare Expressionsmuster nachgewiesen.

Die Farbunterschiede, wie sie beispielsweise in

Abb. 18 zu sehen sind, sind auf die Verwendung unterschiedlicher Kameras zurückzuführen. Während die zunächst verwendete Kamera SPOT Insight Wide-field 4 Mp Monochrome FireWire Digital Camera with IR Filter (Visitron Systems, Puchheim) die Färbung eher blau darstellt, kommt es bei der Axiocam 305 (Zeiss, Oberkochen) zu einem rötlichen Ton bei der Darstellung.

Die Sonde für Nodal ist eine bereits etablierte Sonde (Levin et al. 1995). Die Sonde für Brachyury zeigt das erwartete Färbemuster im Mesoderm. Die Foxj1-Sonde zeigt ein spezifisches Muster, wobei insbesondere die Expression in der zukünftigen Bodenplatte des Neuralrohrs mit der Expression in anderen Spezies übereinstimmt (Yu et al. 2008; Cruz et al. 2010; Hagenlocher et al. 2013). Gewebe zur sicheren Validierung der Foxj1-Sonde wären beispielsweise die Luftwege adulter Hühner.

Bei der *In-situ*-Hybridisierung werden RNA-Moleküle in fixierten Geweben detektiert. Das Agens, das letztendlich die Funktion eines Gens bestimmt, ist jedoch das kodierte Protein. Allerdings können ohne das Vorhandensein von mRNA schlussendlich keine Proteine synthetisiert werden, sodass der Nachweis von mRNA als Hinweis auf die Synthese von Proteinen dienen kann. Der spezifische Nachweis von Proteinen ist nur mithilfe von Antikörpern möglich. Solche Antikörper stehen allerdings nicht für alle zu untersuchenden Proteine in jeder Spezies zur Verfügung. cRNA-Sonden können hingegen prinzipiell für alle Die Messung der Membrandepolarisation in kultivierten Embryonen erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3). Embryonen, die ohne den Farbstoff inkubiert wurden, zeigten in der *Zona pellucida* keine Färbung. Allerdings weist der Dotter in der *Area opaca* eine Eigenfluoreszenz auf. Die Färbemuster, die sich ergaben, zeigten kein wiederkehrendes Muster, sodass auf eine quantitative Auswertung der Daten verzichtet wurde.

Zur experimentellen Unterdrückung der ATP4 wurde die Substanz SCH28080 verwendet. Mit dieser Substanz konnten in *Xenopus* die stärksten Effekte erzielt werden. Außerdem wurde die Unabhängigkeit der Wirkung vom pH-Wert der Umgebung beschrieben. Dies ist bei Omeprazol, einem anderen an *Xenopus* genutzten Inhibitor, nicht der Fall. Ob SCH28080 auch an Hühnern wirkt, ist bisher nicht beschrieben. Da aber die Unterdrückung der Magensäureproduktion beim Menschen nachgewiesen werden konnte (Ene et al. 1982), die Substanz bei *Xenopus* einen Effekt erzielt (Walentek et al. 2012) und auch die Aktivität der ATP4 von Leishmanien durch SCH28080 unterdrückt wird (Mukherjee et al. 2001), wird davon ausgegangen, dass die Pumpe über viele Tiergruppen hinweg stark konserviert ist und somit SCH28080 auch auf die Aktivität der ATP4 des Huhns inhibitorisch wirkt.

Die Inhibition durch SCH28080 wurde auch an weiteren ATPasen wie der Na⁺/K⁺-ATPase untersucht. Allerdings zeigte sich eine höhere Affinität zur H⁺/K⁺-ATPase (Beil et al. 1986). Die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Substanz wurde auch für weitere Experimente in unserem Labor benutzt. Dabei zeigte sie einen spezifischen Effekt auf Seeigelembryonen (unveröffentlichte Daten Kremnyov). Somit kann auch ein möglicher Zerfall der Substanz bei der Lagerung ausgeschlossen werden.

Da die Unterdrückung bei *Xenopus* in den Stadien der Gastrulation durchgeführt wurde (Walentek et al. 2012), wurden die hier durchgeführten Experimente an Hühnerembryonen entsprechend in den Stadien HH 3+ und HH 4 durchgeführt.

Bei den Unterdrückungsexperimenten mit SCH28080 und den Wnt-Inhibitoren wurde auf die Durchführung der Negativkontrollen weitgehend verzichtet, da die Embryonen nach den Experimenten in allen Fällen die normale linksseitige Expression des Gens *Nodal* zeigten. Zur Auswertung der *Foxj1*-Expression nach der Inhibition mit SCH28080 wurden die Keimscheiben ähnlich lange in der Färbelösung gehalten wie unbehandelte Embryonen, um an der Intensität der Färbung eine annähernd halbquantitative Aussage treffen zu können. Ebenso wurde bei der Nodal-Färbung nach shh-Inhibition vorgegangen.

Dass es überhaupt möglich ist, die *Nodal*-Expression in dem hier verwendeten Kultursystem zu stören, wurde durch die shh-Inhibition mit Cyclopamin gezeigt. Die behandelten Embryonen zeigten eine abgeschwächte oder ausbleibende Expression. Auf morphologischer Ebene zeigte sich eine Randomisierung der Herzschleifenbildung nach rechts oder links (Otto et al. 2014).

4.3 Zilienassoziierte Aspekte

Bei der Suche nach inneren Oberflächen und Höhlen, in denen ein durch Zilien generierter Flüssigkeitsstrom als Mechanismus der Rechts-Links-Symmetriebrechung möglich sein könnte, wurden im Rechts-Links-Organisator des Huhns die bereits von Carpaij 2014 beschriebenen kleinen Räume gefunden. Sie kommen in Stadium HH 3+ vor der Knotenbildung und auch im dann in Stadium HH 4 gebildeten Knoten vor. In Hühnerembryonen in Stadium HH 3 wurden diese Räume bisher nicht gefunden (Reinermann, unveröffentlichte Daten¹). Erst ab Stadium HH 3+ sind sie in allen untersuchten Embryonen bis mindestens Stadium HH 8 vorhanden. Embryonen in höheren Stadien wurden bisher nicht untersucht. Ab dem Zeitpunkt, zu dem der Knoten selbst morphologisch definitiv asymmetrisch ist - Stadium HH 5-, sind diese Räume vor allem in der rechten Knotenschulter lokalisiert. Dabei handelt es sich um Extrazellularräume im ansonsten dichten Ektoderm und Mesoderm des Hensen-Knotens und des knotennahen, axialen Mesoderm. Da die Räume, die zunächst als intraepithelial spaces bezeichnet wurden, anders als ursprünglich beschrieben neben dem Vorkommen im Epithel (Carpaij 2014) vor allem auch im Mesoderm des Knotens und im knotennahen axialen Mesoderm vorkommen, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit umbenannt. Durch ihre Konfiguration als kleine Höhlen und ihr ausschließliches Vorkommen in der Region des Hensen-Knotens wurden sie als nodal microcavities NMC bezeichnet (nodal hier im Sinne des englischen Terminus Hensen's node).

4.3.1 Nodal microcavities im Hensen-Knoten der Gastrulationsstadien

Die NMC können klar von den zahlreichen anderen Extrazellularräumen abgegrenzt werden. Das umliegende Mesoderm weiter lateral weist sehr weite Extrazellularräume auf. Allerdings sind diese – anders als die NMC – nicht mit einer Matrix gefüllt. In den nach Richardson gefärbten Semidünnschnitten zeigt diese Matrix eine typische hellblaue Färbung. Außerdem können die NMC eindeutig von den kreisrunden und meist grau-gelb gefärbten intrazellulären Dotterkugeln unterschieden werden. Diese kommen in sehr vielen Zellen des Epiblast und des Mesoderm vor. In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen stellen vermutlich die kraterförmigen Einsenkungen in vielen der gebrochenen Zellen die Stellen dar, an denen sonst die Dotterkugeln intrazellulär liegen. Auch die Zellfragmente in der Primitivgrube sind morphologisch anders strukturiert als die Matrix der NMC. Sie werden meistens von Zell- und Dotterresten gebildet, zeigen in den Semidünnschnitten eine vesikuläre Struktur und sind wie andere zelluläre Bestandteile dunkelblau gefärbt. In der Phalloidinfärbung sind die Zellfragmente stark angefärbt. Dies lässt auf das Vorkommen von Aktinfilamenten schließen.

¹ Mehrfache persönliche Kommunikation mit meiner Mitdoktorandin Johanna Reinermann im Institut für Anatomie in der Abteilung Embryologie im Frühjahr 2019

Die NMC selbst sind unregelmäßig und unterschiedlich geformt. Allen NMC gemeinsam sind ihre Position im Knoten oder axialen Mesoderm und ihre Füllung mit der Matrix. Einige der NMC, insbesondere die am weitesten anterior liegenden, weisen eine große Ausdehnung entlang der Rechts-Links-Körperachse und entlang der kraniokaudalen Achse auf. Vor allem die Transmissionselektronenmikroskopie hat sich als hilfreich bei der Differenzierung der NMC von anderen Extrazellularräumen erwiesen. Hier wurde wie auch in der Rasterelektronenmikroskopie die Matrix, mit der die NMC gefüllt sind, als fibrilläres oder filamentöses Material identifiziert. Allerdings sind zur zweifelsfreien Identifikation der NMC Semidünnschnitte ausreichend. In der Transmissionselektronenmikroskopie wurden daneben auch die umgebenden Zellen sichtbar. Sie bilden Zell-Zell-Kontakte, die unreif wirken. Sie erinnern an kiss-like contacts (Forge et al. 2013). Häufig wurden die NMC auf der Höhe gefunden, auf der in unmittelbarer Nachbarschaft die Basalmembran den Epiblast vom Mesoderm trennt. Im Knoten ist die Basalmembran allerdings unterbrochen, weil an dieser Stelle EMT stattfindet (Kalluri und Weinberg 2009). Aufgrund der räumlichen Assoziation zur Basalmembran wurden Immunfärbungen gegen Proteinbestandteile der Basalmembran durchgeführt. Die gefärbten Bereiche nach der Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen Fibronektin sind im Knoten ähnlich verteilt wie die NMC in den Semidünnschnitten. Außerdem hat sich eine sehr schwache Färbung in der gesamten Keimscheibe ergeben, wobei die Mittellinie im Bereich des Primitivstreifens und des Hensen-Knotens ausgespart ist. Diese Ergebnisse decken sich mit der Verteilung der Basalmembran in der Keimscheibe. Technovit®-Schnitte von immunhistochemisch gefärbten Embryonen gegen Fibronektin zeigen, dass die Färbung auch in ihrer Verteilung in den Zellschichten des Hensen-Knotens zur Lokalisation der Basalmembran und der NMC im Hensen-Knoten passt. Daher kann Fibronektin als Bestandteil der Matrix in den NMC angesehen werden. Allerdings ist Perlecan als weiterer Bestandteil der Basalmembran (Candiello et al. 2007) anders verteilt. Im Knoten sind zwar ebenfalls große gefärbte Areale sichtbar, die Färbung zeigt sich aber zusätzlich entlang des gesamten Primitivstreifens an der "Kante" der Basalmembran.

In vorherigen Studien wurde bisher nicht über das Vorkommen von NMC berichtet, obwohl zahlreiche Studien zu den Gastrulationsstadien des Hühnerembryos (Kölliker 1879; Rabl 1897; Wetzel 1929; Pasteels 1937; Spratt 1947; Hamburger und Hamilton 1951; Schoenwolf et al. 1992; Stern 2004) und dem Hensen-Knoten als archetypischem Organisator der Amnioten vorliegen (Waddington und Schmidt 1933; Izpisúa-Belmonte et al. 1993; Johnson et al. 1994; Levin et al. 1995; Ruiz i Altaba et al. 1995; Lopez-Sanchez et al. 2005). Dabei sind NMC in einigen Abbildungen bisher veröffentlichter Semidünnschnitte erkennbar, finden allerdings keine Erwähnung (Abb. 12, 25 und 26 in Dathe et al. 2002; Abb. 2I und G Tsikolia et al. 2012). Auch in ultrastrukturellen Analysen wurden bisher keine NMC beschrieben. Darunter sind auch einige Beschreibungen von gebrochenen Embryonen. Wahrscheinlich sind die NMC zu klein und ohne Fokus auf den Hensen-Knoten daher nicht gefunden worden (Bancroft und Bellairs 1974; Jacob et al. 1974; Bancroft und Bellairs 1975; Bancroft

und Bellairs 1976; England und Wakely 1977; Wakely und England 1977; Wakely und England 1978; Meier 1979; Wakely et al. 1979). Auch in bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Verteilung von Fibronektin in Hühnerembryonen fand die Färbung im Knoten, die hier gefunden wurde, keine Erwähnung (Critchley et al. 1979; Wakely et al. 1979; Sanders 1982; Jacob et al. 1991; Nakaya et al. 2008). In diesen Studien wurde die Kolokalisation von Fibronektin mit der Basalmembran gezeigt. Außerdem wurden stärker gefärbte Bereiche am Rand der *Area pellucida* gefunden, die als *interstitial bodies* bezeichnet wurden (Low 1970; Sanders 1982).

4.3.1.1 Mögliche homologe Strukturen und ähnliche Strukturen in anderen Vertebraten

In anderen Wirbeltierspezies sind Strukturen vorhanden, die genau wie die NMC räumlich streng mit dem Knoten und dem axialen Mesoderm assoziiert sind. In manchen Säugetieren wie beispielsweise im Pferd bildet sich in der Chorda dorsalis ein Kanal (Walter et al. 2010). Dieser Chordakanal geht der Öffnung der Chordaplatte zum Dottersack hin voraus (Blum et al. 2007). In Primaten und auch in menschlichen Embryonen wird durch den Knoten hindurch ein Kanal gebildet, der die Amnionhöhle mit der Dottersackhöhle verbindet – der sogenannte neurenterische Kanal (Rulle et al. 2018). In Hühnerembryonen, deren Chorda dorsalis während der gesamten Entwicklung von Hypoblast und Endoderm bedeckt ist, kommen solche Kanäle nicht vor. Allerdings könnte es sich bei den NMC um homologe Strukturen handeln. Für diese These spricht, dass die NMC mit genau den embryonalen Strukturen assoziiert sind, in denen sowohl der Chordakanal als auch der neurenterische Kanal auftreten. Als konträres Argument könnte aufgeführt werden, dass sowohl der Chordakanal als auch der neurenterische Kanal von epithelial differenzierten Zellen begrenzt werden, deren apikale Zellmembrandomänen jeweils zum Lumen hin zeigen. Die Zellen um die NMC herum haben mesenchymalen, unpolarisierten Charakter. Ob es sich bei den angrenzenden Membranen dennoch um apikale Membranen handelt, müsste mithilfe weiterer Immunfärbungen geklärt werden. Vorläufige Daten zu Färbungen mit dem Antikörper EMA-1 (DSHB, Iowa), der neben Keimzellen auch die apikalen Zellmembranen färbt (Hahnel und Eddy 1987), zeigen keine Färbung im Hensen-Knoten (Nordbrink, unveröffentlichte Daten).

Eine Struktur, die von mesodermalen Zellen gebildet wird, ist das Urdarmdach von *Xenopus*-Embryonen (Sáenz-Ponce et al. 2012). Diese Struktur ist als Rechts-Links-Organisator in dieser Spezies bekannt und trägt die Zilien, die den gerichteten Flüssigkeitsstrom hervorrufen, der dann zur linksseitigen Expression des Gens *Nodal* führt. Insbesondere die großen NMC, die weit anterior im Knoten auf Höhe der Basalmembran liegen, entsprechen in ihrer Ausdehnung dem Urdarmdach.

4.3.1.2 Mögliche Funktionen der NMC

Die NMC wurden bei der Suche nach inneren Räumen im Rechts-Links-Organisator des Huhns zur Ermöglichung eines durch Zilien generierten Flüssigkeitsstroms zur Symmetriebrechung nachgewiesen. Es zeigten sich zwar membranumschlossene Fortsätze im Lumen der NMC, darin wurden aber keine typischen Mikrotubuli gefunden, die diese Fortsätze als motile Zilien kennzeichnen würden. In den Zellfortsätzen wurden hingegen dünne Filamente gefunden. Außerdem sind im Lumen fibrilläre Strukturen nachgewiesen worden, die Proteine der extrazellulären Matrix enthalten. Da sich die NMC oft auf Höhe der Basalmembran und ausschließlich im sich bildenden und definitiven Hensen-Knoten befinden, stellt sich die Frage nach ihrer Funktion. Naheliegend wäre eine Funktion, die mit den verschiedenen Rollen des Hensen-Knotens verknüpft ist: i)Seine Rolle als Rechts-Links-Organisator bei der Rechts-Links-Symmetriebrechung; ii) Seine Rolle als Organ, das die axialen Strukturen bildet; iii) Seine Rolle als Ort, an dem viele Morphogene auf verschiedene Prozesse wirken.

Zu i): Die NMC sind spezifisch im Rechts-Links-Organisator des Huhns lokalisiert (Otto et al. 2014) und befinden sich damit in der Struktur, die homolog zu den Zilien-tragenden Organen anderer Wirbeltierembryonen ist. Dazu gehören das Kupffer-Vesikel der Fische (Brummett und Dumont 1978; Essner et al. 2005) und das Urdarmdach von *Xenopus* (Schweickert et al. 2007). In diesen Organismen werden Zilien für die Symmetriebrechung als unerlässlich angesehen. Das Auftreten der NMC ab Stadium HH 3+, noch vor dem Auftreten der ersten molekularen oder morphologischen Asymmetrien, legt eine mögliche Rolle der NMC bei der Rechts-Links-Symmetriebrechung nahe. Allerdings wurden hier – noch einmal – keine Hinweise auf das Vorkommen motiler Zilien in den NMC gefunden. Daher stellen die NMC vermutlich keinen Teil eines konservierten Mechanismus zur Rechts-Links-Symmetriebrechung dar. Allerdings könnten sie auf andere – bisher unbekannte – Art und Weise in den Prozess der Symmetriebrechung involviert sein. Da sie ab den asymmetrischen Knotenstadien vermehrt auf der rechten Seite gefunden werden, könnten sie auf eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der rechten Identität der rechten Knotenschulter spielen.

Zu ii): Der Hensen-Knoten ist – wie auch der Organisator von *Xenopus* – die Quelle für Zellen, die das axiale Mesoderm und die medialen Anteile des paraxialen Mesoderm bilden (Nicolet 1970; Rosenquist 1983; Selleck und Stern 1991; Lopez-Sanchez et al. 2001). So könnten die NMC aufgrund ihrer Lokalisation in dieser Region an der Migration der Zellen des Epiblast und des Mesoderm unter anderem in das axiale Mesoderm beteiligt sein. Die NMC werden häufig an der Position gefunden, die äquivalent zum HINC, dem *hinge of involuting notochoral cells*, sind. Diese Struktur wurde in Primatenembryonen als die Stelle beschrieben, an der Zellen aus dem Epiblast ins Mesoderm um die Basalmembran herum wandern und sich dann in das axiale Mesoderm einlagern (Rulle et al. 2018). Fibronektin wurde im Zusammenhang mit der Regulation von Zellmigration von epithelialen und mesenchymalen Zellen beschrieben. Dabei dient es als Co-Stimulator für die Migration von Endothelzellen, wenn es Wachstumsfaktoren gebunden hat (Rahman et al. 2005). Bei der Migration von Zellen des Mesoderm und von Neuralleistenzellen spielt das Fibronektin in

den *interstitial bodies* (s.o.) am Rand der Zona pellucida eine Rolle (Newgreen und Thiery 1980; Sanders 1982).

Zu iii): Die NMC könnten an der Regulierung der Morphogenaktivität im Hensen-Knoten beteiligt sein. Ähnliche Räume wie die NMC, sogenannte Microlumina, wurden in den Anlagen der Seitenlinienorgane von Zebrafischen beschrieben. In ihrem Lumen kommt FGF8 vor. Dieses Morphogen ist an der korrekten Positionierung der einzelnen Rezeptoreinheiten des Seitenlinienorgans beteiligt (Durdu et al. 2014). Ähnlich dazu könnten auch Morphogene in den NMC vorkommen. Zusätzlich sind Proteine der extrazellulären Matrix nicht nur formgebende Komponenten, sondern können auch die räumliche und zeitliche Verteilung von Morphogenen regulieren. Die einzelnen Proteine der extrazellulären Matrix bestehen aus mehreren Domänen. Manche davon sind unter anderem in der Lage, andere Proteine zu binden. Zu diesen gebundenen Proteinen gehören FGF (Smith et al. 2007; Asada et al. 2009), hedgehog (Park et al. 2003), BMP (Billings et al. 2018) und Wnt (Baeg et al. 2001). Funktionell spielt diese Bindung in verschiedenen Prozessen eine Rolle. Die Bindung von FGF8 an Heparansulfat wird beispielsweise für die Bindung an dessen Rezeptor benötigt (Loo und Salmivirta 2002). Außerdem kann Heparansulfat die Diffusion der Morphogene begrenzen (Han et al. 2004; Han et al. 2005) und deren Abbau verlangsamen (Bornemann et al. 2004). Extrazellularmatrixproteine wie Kollagene, Fibrillin und auch das in den NMC vorkommende Fibronektin sind in der Lage, Proteine der TGFβ-Familie zu binden und sogenannte large latent complexes zu bilden (Taipale et al. 1996). Diese Komplexe können die Interaktion der Signalmoleküle mit ihren Oberflächenrezeptoren hemmen. Erst ihre Proteolyse ermöglicht die Bindung der Liganden an seinen Rezeptor. Ein solcher Mechanismus konnte für Chordin in Xenopus-Embryonen gezeigt werden. Chordin wird in der dorsalen Urmundlippe sezerniert und bildet einen Gradienten entlang einer Fibronektinreichen Struktur unterhalb des Ektoderm (Plouhinec et al. 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass manche Domänen von Proteinen der extrazellulären Matrix durch limitierte Proteolyse selbst zu Signalmolekülen werden können. Die so entstehenden Gewebshormone werden dann als Matrikine bezeichnet. Aus Fibronektin können beispielweise Matrikine freigesetzt werden, die die Zellmobilität unterstützen (Joshi et al. 2017). Als Proteasen kommen hierfür insbesondere Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) infrage. MMP 15 ist in der Lage, spezifisch Fibronektin zu degradieren (D'ortho et al. 1997). Sie wird auch als Membran-Typ2-MMP bezeichnet, da sie ein Transmembranprotein ist. Sie kommt im Primitivstreifen in HH 4 vor und wird insbesondere im Hensen-Knoten des Huhns ab Stadium HH 5 stark exprimiert (Geisha). MMP17 - auch bekannt als MT4-MMP - ist in Stadium HH 4 bereits sehr stark im Knoten exprimiert (Geisha).

4.3.2 Expression zilienassoziierter Gene

Eine Foxj1-Expression, die dem hier gezeigten Muster ähnlich ist, wurde bereits in der Bodenplatte des geschlossenen Neuralrohrs gezeigt (Cruz et al. 2010). Hier wurde die Expression von Foxj1 auch schon vor der Bildung des Neuralrohrs nachgewiesen. Im Hensen-Knoten konnte allerdings keine Expression gefunden werden. Ebenso wurde keine *Rechts-Links-Dynein*-Expression gefunden. Auf morphologischer Ebene wurden bereits Zilien im Neuroepithel von Hühnerembryonen beschrieben (Sotelo und Trujillo-Cenóz 1958). In Zusammenschau kann auch im Rahmen dieser Arbeit kein Zilien-tragendes Gewebe im Rechts-Links-Organisator des Huhns identifiziert werden, sodass weiterhin von alternativen Mechanismen zur Rechts-Links-Symmetriebrechung ausgegangen werden muss.

4.4 ATP4-assoziierte Aspekte der Rechts-Links-Symmetriebrechung des Huhns

Die Ionenfluss-Hypothese stellt eine alternative Hypothese zur Zilienstrom-Hypothese bezüglich der initialen Rechts-Links-Symmetriebrechung in Wirbeltieren dar (Levin et al. 2002; Blum et al. 2014a). Etabliert wurde diese Theorie vor allem in *Xenopus*-Embryonen. Hierbei soll die Protonenpumpe des Magens ATP4 asymmetrisch exprimiert werden und somit gemeinsam mit weiteren Ionenkanälen einen Depolarisationsgradienten schaffen, der zur asymmetrischen Verteilung von kleinen Molekülen wie Serotonin über *gap junctions* führt. Diese Verteilung soll über nicht weiter bekannte Mechanismen letztlich zur asymmetrischen Expression des Gens *Nodal* auf der linken Körperseite führen. Diese asymmetrischen Entwicklung der inneren Organe in der weiteren Entwicklung des Embryos (Shiratori et al. 2006).

Mittlerweile wurde die Ionenfluss-Hypothese allerdings für *Xenopus* in vielen Aspekten widerlegt: 1) Die initial gezeigte asymmetrische Expression der α -Untereinheit der ATP4 konnte nicht bestätigt werden (Walentek et al. 2012); 2) Connexine als Komponenten der *gap junctions* sind zwar an der Rechts-Links-Differenzierung beteiligt, kommen aber erst in der späteren Entwicklung zum Tragen. Sie sind nicht an der initialen Symmetriebrechung, sondern eher an der Übertragung der Information zum Seitenplattenmesoderm beteiligt (Beyer et al. 2012a); 3) Serotonin als kleines, asymmetrisch verteiltes Molekül ist ebenfalls an der Rechts-Links-Symmetriebrechung beteiligt. Allerdings nimmt es eine Rolle bei der Bildung der motilen Zilien auf den Zellen des Urdarmdachs ein. Die Wirkung wird dabei über den Wnt-Signalweg vermittelt (Beyer et al. 2012b); 4) Die Inhibition der ATP4 führt zu Defekten bei der Rechts-Links-Differenzierung. Allerdings werden durch die Inhibition die Zilien auf den Zelle angelegt. Dieser Prozess wird – ebenfalls vermittelt über den Wnt-Signalweg – über die verminderte Expression von *Foxj1* in inhibierten Embryonen erklärt (Walentek et al. 2012).

Daher sollten einige Komponenten der Ionenfluss-Hypothese auch in dem zweiten in der Originalarbeit untersuchten Modellorganismus Huhn überprüft werden. Initial wurde die Expression des Gens für die α - und β -Untereinheit der ATP4 symmetrisch im Primitivstreifen und im Hensen-Knoten beschrieben (Levin et al. 2002). Die Überprüfung der in der Originalarbeit angegebenen Sequenz (GenBank accession number AL588035) ergab in der Suche mit dem basic local alignment search tool (BLAST) eine 99,75% Übereinstimmung mit der α2-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase ATP1A2. Die cDNA-Sequenzen der ATP1A2 und der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ATP4a (GenBank accession number KF745925.1) gleichen sich zu 75%. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Sonde für die ATP4a selbst kloniert. Die Position der dazu verwendeten Primer und damit auch die Sequenz der Sonde selbst wurden in sehr wenig homologe Bereiche der cDNA gelegt. So sollte eine Kreuzreaktion mit mRNA einer anderen ATPase ausgeschlossen werden. Außerdem wurde die Sonde so gewählt, dass sie die Grenzen von einem Exon zum nächsten beinhaltet, sodass nur prozessierte mRNA gefärbt werden konnte. Hinweise auf die hohe Spezifität der hier generierten Sonde ergeben sich aus der Färbung der Mägen der Embryonen in Stadium HH 32. Diese Färbung beschränkt sich genau wie erwartet auf den Drüsenmagen. Die anderen Anteile des Gastrointestinaltrakts sind nicht gefärbt. In den Stadien der Rechts-Links-Symmetriebrechung wurde für beide Untereinheiten der ATP4 ein symmetrisches Expressionsmuster gefunden. Eine starke Expression ist im Bereich des sogenannten amnio-cardiac vesicle zu finden. Hieraus soll das Kreislaufsystem des Huhns entstehen (Bellairs und Osmond 2014). Aufgrund der symmetrischen Expression der ATP4 kann eine Asymmetrie auf dem Boden einer asymmetrischen Expression der ATP4 im Huhn ausgeschlossen werden. Allerdings müssten zum endgültigen Beweis zusätzlich Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen die ATP4 durchgeführt werden. Dadurch ließe sich eine asymmetrische Bildung der ATP4 auch auf Translationsebene ausschließen. Vorläufige, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen die ATP4, zeigten bisher allerdings ein symmetrisches Muster (der Antikörper wurde freundlicherweise von Käthi Geering, Lausanne zur Verfügung gestellt, Originalarbeit: Claeys et al. 1997). Die Validierung der Färbung steht jedoch aus.

Nachdem die ATP4 in ihrer Verteilung symmetrisch erscheint, könnte aber auch eine asymmetrische Aktivität der Protonenpumpe zu Unterschieden in der Membrandepolarisation führen. In der Originalarbeit zur Ionenfluss-Hypothese wurde eine vermehrte linksseitige Membrandepolarisation in den Stadien HH 3 und HH 4 an Embryonen in ovo gefunden (Levin et al. 2002). Diese Daten sollten unter Kulturbedingungen überprüft werden. Da die Embryonen auch in der hier verwendeten Kultur eine morphologisch und molekular immer normale Rechts-Links-Differenzierung zeigen, sollte der zugrunde liegende Mechanismus auch in der Kultur zu finden sein. Eine klare Zuordnung der stärkeren Depolarisation zu einer Seite gelang allerdings nicht. Entweder spielen Depolarisationsmuster in Hühnerembryonen demnach keine Rolle bei der Rechts-Links-Differenzierung, oder es kommt über die Zeit zu einer wellenartigen Depolarisation. Diese könnte sich zyklisch über den Embryo ausbreiten. Eine solche wellenartige Ausbreitung wäre bei der einzeitigen Aufnahme eines Embryos, wie sie hier durchgeführt wurde, nicht gefunden worden. Um dieser Frage nachzugehen, wären Live-imaging-Ansätze notwendig, bei denen die Embryonen während der Inkubation mit DiBAC4(3) immer wieder fotografiert werden müssten. Fraglich ist dabei, ob die Substanz vorher vom Embryo abgespült werden sollte.

Verbleibt die Lösung auf dem Embryo, könnte auch das Signal von der extrazellulären Lösung detektiert werden. Wird die Lösung abgespült werden, könnten die depolarisierenden Zellen eventuell keine neue Substanz mehr aufnehmen.

eindeutiges Nachdem die Depolarisationsmuster kein Bild ergaben, wurden Unterdrückungsexperimente der ATP4 mit SCH28080 an kultivierten Embryonen durchgeführt. Der dazu verwendetet Inhibitor SCH28080 wurde hierzu auf Embryonen in Kultur aufgebracht. Anschließend wurden die Stadien der asymmetrischen Nodal-Expression auf die Expression des Gens Nodal untersucht. Allerdings zeigte sich die Expression in allen behandelten Embryonen wie im Normalfall auf der linken Seite. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Daten aus Xenopus, Ciona und Seeigeln, in denen es nach der Behandlung mit Protonenpumpeninhibitoren zu Defekten der molekularen Rechts-Links-Differenzierung kommt (Hibino et al. 2006; Shimeld und Levin 2006; Walentek et al. 2012). Insbesondere bei Xenopus wurde nach der Unterdrückung der ATP4-Aktivität eine fehlerhafte Positionierung der Zilien auf den Zellen des Urdarmdachs gezeigt. So wurde eine Verbindung zwischen der Ionenfluss-Hypothese und der Zilienstrom-Hypothese hergestellt, womit erklärbar ist, wieso auch in früheren Experimenten die ATP4-Inhibition in Xenopus zu Rechts-Links-Defekten führen konnte (Levin et al. 1995; Walentek et al. 2012). Die Inhibition der ATP4 in Xenopus führt zu einer verminderten Expression des Mastergens für motile Zilien Foxj1 (Walentek et al. 2012). Darüber hinaus konnte nach der Unterdrückung der ATP4 auch eine Wirkung auf die Bildung der motilen Zilien auf der Epidermis von Kaulquappen von Xenopus gezeigt werden. Eine Unterdrückung der ATP4-Expression führte zum Fehlen von Zilien auf Zellen, die normalerweise einen dichten Besatz von Zilien tragen (Walentek et al. 2015). In Hühnerembryonen zeigte sich allerdings nach der Unterdrückung der ATP4-Aktivität eine normale Foxi1-Expression. Dies passt jedoch zu der Beobachtung, dass auch die Nodal-Expression in Hühnerembryonen nach der ATP4-Inhibition ungestört ist.

Die Verbindung zwischen der ATP4 und der Expression des Gens *Faxj1* soll über den Wnt-Signalweg hergestellt werden (Walentek et al. 2012). In Zebrafischen wurde die direkte Abhängigkeit der *Faxj1*-Expression von Wnt gezeigt (Caron et al. 2012). Daher wurden Inhibitoren des Wnt-Signalwegs an Hühnern in Kultur getestet. Aber auch hier blieb die *Nodal*-Expression in allen untersuchten Embryonen auf der linken Seite lokalisiert, sodass die Rechts-Links-Differenzierung in Hühnerembryonen unabhängig vom Wnt-Signalweg zu verlaufen scheint.

Insgesamt lässt sich eine Beteiligung der ATP4 an der Rechts-Links-Symmetriebrechung der Hühner nach diesen Daten weitestgehend ausschließen. Es müssen also andere Mechanismen zur molekularen Rechts-Links-Symmetriebrechung vorhanden sein. Da die morphologische Symmetriebrechung in Hühnerembryonen besonders früh stattfindet, ist die Beobachtung der gerichteten Zellbewegungen ein vielversprechender Ansatz, die Symmetriebrechung auch in Hühnerembryonen zu verstehen.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bisher gängigen Hypothesen zur Rechts-Links-Symmetriebrechung der Wirbeltiere in Hühnerembryonen in einigen Aspekten beleuchtet. Auch in den hier genauer charakterisierten inneren Räumen im Hensen-Knoten - dem Rechts-Links-Organisator des Huhns - konnten weiterhin keine Zilien gefunden werden. Ebenso ergab die Untersuchung einiger Komponenten der Ionenfluss-Hypothese keine Hinweise auf eine Beteiligung der ATP4 oder bestimmter Depolarisationsmuster an der Rechts-Links-Symmetriebrechung. Da aber auch Hühner in ihrem Inneren konsistent immer zur gleichen Seite hin asymmetrisch sind, muss auch in diesem Organismus in der Embryonalentwicklung die Rechts-Links-Symmetriebrechung gerichtet stattfinden. Phänomenologisch wurden im Hühnerembryo gerichtete Zellbewegungen um den Hensen-Knoten beschrieben (s. 1.4.3). Die Grundlage für solche asymmetrischen Zellbewegungen sind am ehesten unter den Bestandteilen des Zytoskeletts zu suchen. Diese könnten als F-Moleküle dienen (Brown und Wolpert 1990). In diesem Sinne wurde die Aktivität der Zytoskelettbestandteile Aktin und Myosin in der Zygote und im 4-Zell-Stadium des Fadenwurms C. elegans mit der Rechts-Links-Symmetriebrechung in Verbindung gebracht (Naganathan et al. 2014). Diese beiden Zytoskelettbestandteile kommen in praktisch allen Tieren vor und könnten somit auch in anderen Spezies beispielsweise im Rahmen von asymmetrischen gerichteten Zellbewegungen, wie sie im Huhn beschrieben wurden, an der Rechts-Links-Symmetriebrechung beteiligt sein (Gros et al. 2009). Die gerichteten Zellbewegungen gehen im Huhn mit der Drehung des Hensen-Knotens einher. Zur letztendlichen Klärung, wie die Richtung der Zellbewegungen und der Knotendrehung festgelegt wird, sind weitere Experimente notwendig. Hierzu könnten Ansätze wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete live-imaging genutzt werden, um experimentell beispielweise durch Inhibition der Interaktion zwischen Aktin und Myosin Störungen der Zellbewegungen hervorzurufen.

Außerdem könnten die NMC weiter untersucht werden. Dazu könnten Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Fibronektin und verschiedene Morphogene durchgeführt werden, um zu klären, ob in den NMC tatsächlich Signalmoleküle vorkommen. Außerdem sind sie bisher nur in Hühnern nachgewiesen worden. Ob die NMC auch in weiteren Spezies auftreten, muss noch geklärt werden. Zunächst sollten dazu weitere Vogelspezies wie die nahe verwandten Wachteln oder die weitläufiger verwandten Enten untersucht werden. Schließlich könnte in funktionellen Experimenten die Funktion der NMC gemäß den hier formulierten Vermutungen untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Morphologische Asymmetrien entlang der Rechts-Links-Körperachse sind ein weit verbreitetes Phänomen im Tierreich. Bezüglich der Prozesse, die im symmetrisch angelegten Embryo zu den morphologischen Asymmetrien führen, bestehen unterschiedliche Hypothesen. Einerseits könnten rotierende Zilien auf der Oberfläche des sogenannten Rechts-Links-Organisators - ein Gewebe mit der Fähigkeit, morphogenetische Prozesse zu steuern - über einen Flüssigkeitsstrom die initial vorhandene Symmetrie brechen (Zilienstrom-Hypothese). Andererseits wird eine durch Ionenpumpen generierte ungleichmäßige Verteilung der Ionen im frühen Embryo als Ursache der initialen Symmetriebrechung diskutiert (Ionenfluss-Hypothese). Im Huhn fehlen bisher Hinweise auf das Vorhandensein von Zilien auf dem Rechts-Links-Organisator, dem Hensen-Knoten; zur asymmetrischen Ionenverteilung gibt es jedoch vielversprechende Befunde, da sie letztlich, ebenso wie die Positionierung der Zilien in anderen Spezies, durch chirale F-Moleküle bestimmt werden könnte. F-Moleküle zeigen eine intrinsische Chiralität und richten sich an den zuvor etablierten Körperachsen aus. In dieser Arbeit werden zu beiden Hypothesen einerseits licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen und andererseits Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene auch nach Unterdrückungsexperimenten in vitro vorgestellt. Zeitrafferaufnahmen von transgenen, GFP-markierten Embryonen bestätigen asymmetrische Zellbewegungen in der Nähe des Hensen-Knotens. Im Knoten werden mit den nodal microcavities (NMC) innere Oberflächen gefunden, die in dieser Arbeit erstmals rasterelektronenmikroskopisch charakterisiert werden: In mit feinen Fibrillen beladene Räume ragen membranumschlossene Fortsätze hinein; jedoch gleicht deren Inneres dem Zytoplasma der umliegenden Zellen und enthält nicht das typische Zytoskelett des Zilienapparates. Unter den immunhistochemischen Färbungen für extrazelluläre Matrixmoleküle liefert der Basalmembranbestandteil Fibronektin die beste Übereinstimmung mit der Verteilung der NMC. Die Zilien-assoziierten Gene Foxj1 und Rechts-Links-Dynein sparen mit ihren Expressionsdomänen den Hensen-Knoten aus, während die Untereinheiten der H^+/K^+ - ATPase ATP4, die für die asymmetrische Ionenverteilung zuständig sein soll, in einer symmetrischen Verteilung auftreten. Die Untersuchungen zur Membrandepolarisation ergaben sowohl symmetrische Muster als auch stärker linksseitig stärker rechtsseitig betonte Depolarisationsmuster. Die pharmakologische und Unterdrückung der ATP4 resultierte für die Gene Foxj1 und Nodal, den Marker für die molekulare Symmetriebrechung, in einer normalen Expression. Insgesamt ergaben sich in dieser Arbeit demzufolge weder morphologische noch molekulare Hinweise auf das Vorkommen motiler Zilien im Bereich des Rechts-Links-Organisators. Ebenso konnten die Daten zur Ionenfluss-Hypothese die publizierten Hinweise auf einen kausalen ATP4 Zusammenhang zwischen der und der Rechts-Links-Ionenpumpe Symmetriebrechung nicht bestätigen. Allerdings eröffnen die NMC neue Perspektiven für die Rechts-Links-Symmetriebrechung, weil sie Fibronektin enthalten, das als Speicher für die morphogenen Signale des Hensen-Knotens als Rechts-Links-Organisator dienen könnte.

6 Anhang

6.1 Listen der verwendeten Geräte und Materialien

6.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle A1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung/Typ	Hersteller
Autoklav	VX-65	Systec, Linden
Brutmaschine	Modell 400	Brutmaschinen-Janeschitz, Hammelburg
Diamantmesser	Ultra 45°	Diatome, Nidau, Schweiz
Drucker für Gelfotos	P91D	Mitsubishi, Ratingen
Eismaschine	AF80	Scotsman Ice Systems, Sprockhövel
Elektronisches Vorschaltgerät	EBQ 100-04	LEJ, Jena
Elektroporator	MicroPulser	Bio-Rad, München
Eppendorfpipetten	2,5, 10, 200, 1000	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	E2000D	Sartorius, Göttingen
Geldokumentation Gelelektrophoresekammer	EpiChem3 Darkroom	Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge Angewandte Gentechnologie
Heizblock	QBD2	System GmbH, Heidelberg Grant, Cambridgeshire (UK)
Heizplatte	4P100 50Hz	Gowina-Hofmann, Berlin
Inkubationskammer	XL-3	Carl Zeiss, Oberkochen
Inkubator für Bakterienplatten Iridektomieschere nach	Function Line	Heraeus, Hanau Greuder, Heidelberg
Wecker		
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera	Axiocam 305	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera	SPOT Insight Wide-field 4 Mp Monochrome FireWire Digital Camera with IR Filter	Visitron Systems, Puchheim
Kontrastiergerät	EM ACEC200	Leica, Nußloch
Kühlzentrifuge	5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Axioplan mit AxioCam MRc5	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	Axiovert 200M Trinocular Phase Contrast Fluorescence Inverted Microscope	Carl Zeiss, Oberkochen

Mikroskop	Axioplan 2	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotom	Jung RM 2065	Leica, Nußloch
Mikrotom	Ultracut E	Reichert-Jung, jetzt Leica, Nußloch
Mikrowelle	MD10482	Medion, Mühlheim
pH-Meter	PHM61	Radiometer AIS (Kopenhagen)
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pinzetten	Dumont #5SF	Fine Science Tools, Heidelberg
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg
Rasterelektronenmikroskop	Feldemissionsrasterelektron enmikroskop Zeiss Ultra Plus	Carl Zeiss, Oberkochen
Schaukel	Thermolyne® Vari-Mix	Thermo-Fisher Scientific, Schwerte
Schüttelinkubator	innova 4000	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	innova TM 4000	New Brunswick Scientific,
Spannungsgeber	SAE 2761	Nürnberg Shandon Southern, Cambridge, Großbritannien
Stereolupe	Stemi SV 11	Carl Zeiss, Oberkochen
Stereolupe	Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Oberkochen
Stereolupe	SZX12	Olympus, Hamburg
Temperaturregulation	tempcontrol 37-2 digital	Meyer Instruments, Houston, Texas, USA
Thermocycler	PTC-200	Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge	Sprout®Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific, Nottingham (UK)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5423	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	AL 220 VAC	Roth, Karlsruhe
Transmissionselektronen- mikroskop	TEM LEO 906E	Carl Zeiss, Oberkochen
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortex	REAX top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	A100	Lauda, Lauda-Königshofen

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung/Typ	Hersteller
24-well-Platten		Corning, Kaiserslautern
Deckglas	Menzel-Gläser	Thermo-Fisher Scientific, Schwerte
Elektroporationsküvetten	MicroPulser TM	Bio-Rad, München
Falcon-Röhrchen	15 ml und 50 ml	Corning, Kaiserslautern

Glasflaschen	verschiedene Größen	Schott Duran, Mainz
Glasgut	Schalen, Uhrgläser	Schott Duran, Mainz
Glaspipetten	150 mm	Brand, Wertheim
Glasringe für New Kultur		UMG-Werkstatt
Kanülen	Microlance TM 3 20G	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryo-Gefäße für Keim- scheiben		Starlab, Hamburg
Leergelatinekapseln	0,75	G. Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Objektträger	Menzel-Gläser	Thermo-Fisher Scientific, Schwerte
Organkulturschalen	60 mm	Corning, Kaiserslautern
Parafilm		Pechiney plastic packaging, Chicago
Photometerküvetten		Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	weiß, gelb, blau	Starlab, Hamburg
Plastik-Petrischalen	Cellstar® 35 mm und 60 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 1,7 ml, 2 ml	Starlab, Hamburg
serologische Pipetten	10 ml und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	5 ml, 10 ml und 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	FP 30/0,45 CA-S	GE Healthcare Europe
Tablettenhüllen		Bayer, Leverkusen
Transferpipetten	3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

6.1.3 Chemikalien

Tabelle A3: Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO)	Merck, Darmstadt
3',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Serva, Heidelberg
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-	AppliChem, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem, Darmstadt
Agar Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Roche, Grenzach-Wyhlen
Araldit® (CY212)	Serva, Heidelberg
Araldit® (Härter/HY964)	Serva, Heidelberg

Fermentas, Schwerte Auftragspuffer Merck, Darmstadt Azur II Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol) Biotium, Fremont, USA (DiBAC4(3))Roth, Karlsruhe **BM-Purple** Boehringer Blocking Reagenz Roche, Grenzach-Wyhlen Bovine Serum Albumin (BSA) Aurion, Köln Calciumchlorid (CaCl₂) Merck, Darmstadt CDSII-A Biomers, Ulm Cyclopamin Tocris, Bristol, UK Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix) Fermentas, Schwerte Diethyldicarbonat (DEPC) AppliChem, Darmstadt Digoxygenin-Nukleosidtriphosphat (DIG-NTP) Roche, Grenzach-Wyhlen Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich, Taufkirchen Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) Merck, Darmstadt Ethanol AppliChem, Darmstadt Ethidiumbromid-Lösung Roth, Karlsruhe Ethylendiamintetraethylessigsäure (EDTA) AppliChem, Darmstadt Formamid AppliChem, Darmstadt GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder Thermo-Scientific, Schwerte Glutaraldehyd Serva, Heidelberg Glycerol Merck, Darmstadt Hefeextrakt Roth, Karlsruhe Heparin AppliChem, Darmstadt ImmersolTM 518F Carl Zeiss, Oberkochen Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) Sigma-Aldrich, Taufkirchen Kaliumchlorid (KCl) Merck, Darmstadt Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) Merck, Darmstadt Levamisol Sigma-Aldrich, Taufkirchen Lithiumchlorid (LiCl) Calbiochem, Darmstadt LKG-974 Selleckchem, München Magnesiumchlorid (MgCl2) AppliChem, Darmstadt

Maleinsäure Methanol Methylenblau Midori-Green Mowiol Natriumacetat Natriumchlorid (NaCl) Natriumtetraborat (Borax) Natriumtzitrat-Dihydrat Natronlauge Normal Goat Serum (NGS) Orange G Paraformaldehyd (PFA) pGEM®-T easy Vector Phalloidin iFluor 488 Reagent Phalloidin iFluor 555 Reagent Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Propylenoxid Saline sodium citrate (SSC) Salzsäure (HCl) SCH28080 Technovit® 8100 Transfer-Ribonukleinsäure (t-RNA) Transkriptionspuffer Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) Trypton Tween 20 Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂) Wnt-C59 Zitronensäuremonohydrat β-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, Taufkirchen AppliChem, Darmstadt Merck, Darmstadt Nippon Genetics Europe, Düren Hoechst, Frankfurt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Promega, Mannheim Abcam, Cambridge, UK Abcam, Cambridge, UK Roche, Grenzach-Wyhlen Serva, Heidelberg AppliChem, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen Kulzer, Wehrheim Sigma-Aldrich, Taufkirchen Roche, Grenzach-Wyhlen AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt Merck, Darmstadt Cellagen Technology, San Diego, USA Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen

6.1.4 Enzyme

Alle Enzyme wurden mit den jeweils mitgelieferten Puffern in geeigneter Verdünnung verwendet.

Name	Hersteller
Proteinase K	Roche, Grenzach-Wyhlen
reverse Transkriptase	Invitrogen, Karslruhe
Sp6-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-Ligase	Promega, Mannheim
T7-Polysmerase	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim

Tabelle A4: Liste der verwendeten Enzyme

6.1.5 Antikörper

Tabelle A5: Liste der verwendeten Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
Anti-Digoxigenin-Antikörper	1:2.000	Roche, Grenzach-Wyhlen
Anti-Chondroitinsulfat- Antikörper (9BA12)	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Anti-Fibrillin-2-Antikörper (JB3)	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Anti-Fibronektin-Antikörper (VA1(3))	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Anti-Laminin-Antikörper (3H11)	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Anti-Perlecan-Antikörper (5C9)	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Biotinylierter Goat Anti-Mouse IgG (BA-2900)	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien
Cy3™-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:200	Dianova, Hamburg

6.1.6 Kits

Tabelle A6: Liste der verwendeten Kits

Name	Hersteller
RNeasy Plus Mini	Qiagen, Hilden
R.T.U. Vectastain® Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up NucleoSpin	Macherey-Nagel, Düren

6.1.7 Primer

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer zur Klonierung der cRNA-Sonde ATP4a_Gg wurden bei der Firma Biomers, Ulm bestellt.

TabelleA7: Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz 5' \rightarrow 3' (Länge in bp)
ATP4a_Gg_forT	aattggtcatcgtggagagc (20)
ATP4a_Gg_revT	gaagcacgtgaactgctgg (19)
Τ'7	taatacgactcactataggg (20)

6.1.8 Bakterien und Vektoren

Tabelle A8: Liste der verwendeten Bakterien und Vektoren

Name	Hersteller
E. coli DH5α	Clontech, Heidelberg
pGEM®-T easy	Progema, Mannheim

6.1.9 cRNA-Sonden

Die Herkunft der einzelnen verwendeten cRNA-Sonden ist in Tabelle angegeben. Die Sequenzen der Sonden sind in Kapitel 6.1.9.1 aufgeführt.

|--|

Name	Herkunft
ATP4a_Gg	Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert
cATP4a	Hergestellt von der Firma genecust, Ellange, Luxemburg

cATP4b	Hergestellt von der Firma genecust, Ellange, Luxemburg
cFoxj1	Peter Walentek, Universität Freiburg
cLRD	Clifford Tabin, Harvard Medical School, Boston
cNodal	Clifford Tabin, Harvard Medical School, Boston
cT (Brachyury)	Michael Kessel, MPI für Biophysikalische Chemie Göttingen

6.1.9.1 Sequenzen der verwendeten cRNA-Sonden

Sequenz der Sonde ATP4a_Gg

GAAGCACGTGAACTGCTGGTACCGGCGCTGCTCGAACGTCCACTGCTGGCC GTAGCTGTCCTGCAGCTCCCGCTGGTGGGTGTCCTCCCAGTGGGGCCGCAG CCCCACACAGCAGCGGCCACCAGCCCTCCTGCGCCATGGCCACAAAGTAG TCCGTGAAGCCCGCAAAGGACTGGATGGCACCTATTTGGAAGTAGGAATAG GCCGCCAGCGGCTCATTGACCAGGCGGTCCCTGCGGGGGGTTGCGGGGGTTTG AGGTGCATAATGTCGCTCTCTGCGCGTTCGTACGCCAACGACACCGACGGGA AGATGTCGGTGCAGAGCTCGATGAAGAGGATGGTGATGCAGCCGAGGGGC AGCGGGACGCTGGCGGTGATGTAGATGAGGTACGGCGTCAATTCGGGGGAT GTTTTTGGTCAGAGTGTACGCGATGGACGTCGTGCGAAGATCAGG CGGCCCCGCTCCACTCCGGTGACGATGGAGGCGAAGTTGTCGTCCAATAGG ATCATATCGGCCGCGTTTCAGGTGGGGGACCCCGCGATGCCCATCGCCA CCCCAATGTCCGCCGCTTCAGAGCCGGGGAGTCGTTCACACCGTCCCCGT CACCGCCACGATGGCGCCCAGTTTCTGGCAGCTCTCCCACGATGACCAATT

Sequenz der Sonde cATP4a

Sequenz der Sonde cATP4b

GGCAGTGATCTCTTCAACCTTTAGTGGAGGGGAAGGTATAAAAACCAAAGC AGTCTGCTTGGGCAACTCTTTGAGCCCCTGTTGAATTTCTTCATTTCCGAGGA AGACGCTTTTTGGGGGAAATTTTGTGGCAAAATGGCAACTTTAAATGAAAAGA AGACCTGCAGTGAACGGATGGAAAATTTCCGCCGTTTTGTCTGGAATCCAGA AACTAAGCTGTTTATGGGAAGGACCTTGATTAACTGGGTGTGGAATCAGCCT GTACTACCTGGCCTTCTACGTGGTGATGACTGGGATCTTCGCCCTCTCCATAT ACTCCCTAATGAGGACGGTCAATCCCTACGAGCCAGATTACCAAGACCAGCT CAAGTCCCCAGGTGTAACGTTACGACCGGATGTGTATGGGCACAAGAGGGCT GCAAATCTACTACAATGCATCTGACAACAAGACCTGGGAGGGGGCTGGTGAC AATGCTCCAGACGTTTCTGACAGCATATAG/CCCAGCTGCTCAGCATCTGAAC ATCAACTGCACAAGCAACACATACTTCATCCAGAACACCTTTGATGGCCCAAA TAACACAAAACTGTCCTGCAAGTTTACATCAGATATGCTTCAAAACTGCTCTG GCATCACAGATCCTACTTTGGATTTCCAGGAAGGAAAACCTTGCTTTATTGTA AAGATGAACAGGATTATCAAATTTTATCCTGGCAACGGCACCGCACCGAGAG TGGACTGCAGCTATGTAGGTGACGAGTCCCGCCCGC

Sequenz der Sonde cFoxj1

AGCCGGACAGGTACTCATTGCCATCGTCATCCCAGGGGTGCTGCAGGAAGG AGGTGGCCATGAAGGTCTCGTCAAAGTCCAGGTTGTTGTGGTTGGGCTCGG TGAGGGGCTGCTCGGGCCCGGCCACGCACCACTCCTGTGCACCGTCGTGGT ATCCGTGGCCCGTCAGGTCAACATCACGCCCAATGGGGCTGATGGGCGGCG TGAGCTCCAGCTCCTCAAACGTGGTGAAATCTCCATTGAGGTTGGTGTCAAA GACAACCTCCCAGTCGAAGTTGCCCTTCAGCGAGCCCAGCTCGGTCTGCTCC TCCTGGGTGAGCAGGGCCGTGTTGAGCAGCCGGGCCGCCTTGGCCGTGCGT TTGGGTAAGGGCTGCTTGCGCTTGCGGCCGCTCTTCTCATCCCAACTCTGCT CTCCGGTGACCTCTTCAAACTCCTTCAGCAGCTGCTGGGACTCCGTGTTGAC GTTGAGGACGTTGCTGTTGGCGCAGCTGGAAGGCAGCGGCCCGCCGACGCC GCCCGCTTGGCGCTGGGCCCTGTTGGTGAAGGCCGGGTGGATCTGCACCGG GGGCATCCGCCGCTTCTTGAAGGCCCCGTTCATCAGCCGGTCGGCGTACTGA GGGTCGATCTTCCAAAAGCCGCCTTTCCCTGGCTCGTCCTTCTCGCGGGGCA CTITGATGAAGCACTTGTTCAAGGACAGGTTGTGTCGGATGGAGTTCTGCCA GGTGGGGTCGGCGTGTCGGAAGTAGCAGAAGTTGTCGGTAATCCACTTGTA GATGGCGGACAGGGTGATTITGGTCTTCTTGCTGGCTTCCATCGCCATGCAG ATGAGAGTGGCGTAGGAGTAGGGCGGCTTCACGTGCGGGTTGGTCTTGTA GTCGATGTCCTCGGGCGGCTGAGCCTGCAAAGCCGGGTGTGCCGTCCTCGA GGTGGAGG

Sequenz der Sonde cLRD

GGCATGGCCTTCGCAAGGCTGGAGGAGGGCTATGAAAATGCAATTAAGGAC TACAACAAAAAGCAGATCACTCAGCTGAACGCGCTGATCTCGCTGCTCATTG GGAACTTGTCTGCGGGGAGACAGAATGAAGATCATGACGATCTGCACCATCG ATGTGCACGCCAGAGACGTCGTGGCCAAAATGATCCTCACGAAGACCGCGCA GGAGTTTGCATGGCAGTCACAGCTGCGGCACCGCTGGGACGAGGGCCAGA GGCACTGCTATGCCAACATCTGCGACGCGCAGCTGCAGTACGCCTACGAGTA

Sequenz der Sonde cNodal

Sequenz der Sonde cT

6.2 Alignment der klonierten ATP4a_Gg-Sonde



Abb. A1: Alignment der Sequenzierungsergebnisse zur erwarteten Sequenz der ATP4a-Sonde. Übereinstimmende Abschnitte sind rot dargestellt.

7 Literaturverzeichnis

- Adams DS, Robinson KR, Fukumoto T, Yuan S, Albertson RC, Yelick P, Kuo L, McSweeney M, Levin M (2006): Early H+-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. Development <u>133</u>, 1657–1671
- Afzelius BA (1976): A human syndrome caused by immotile cilia. Science 193, 317-319
- Aizawa H (2013): Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. Anat Sci Int 88, 1–9
- 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 <u>5</u>, e8999
- Asada M, Shinomiya M, Suzuki M, Honda E, Sugimoto R, Ikekita M, Imamura T (2009): Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family. Biochim Biophys Acta <u>1790</u>, 40–48
- Aw S, Adams DS, Qiu D, Levin M (2008): H,K-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry. Mech Dev <u>125</u>, 353–372
- Baeg GH, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N (2001): Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. Development <u>128</u>, 87–94
- Bancroft M, Bellairs R (1974): The onset of differentiation in the epiblast of the chick blastoderm (SEM and TEM). Cell Tissue Res <u>155</u>, 399–418
- Bancroft M, Bellairs R (1975): Differentiation of the neural plate and neural tube in the young chick embryo. A study by scanning and transmission electron microscopy. Anat Embryol (Berl) <u>147</u>, 309–335
- 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 <u>35</u>, 383–401
- Bangs F, Antonio N, Thongnuek P, Welten M, Davey MG, Briscoe J, Tickle C (2011): Generation of mice with functional inactivation of talpid3, a gene first identified in chicken. Development <u>138</u>, 3261–3272
- Bastacky J, Hayes TL, Gelinas RP (1985): Quantitation of shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: Human lung. Scanning <u>7</u>, 134–140
- Beddington RS (1994): Induction of a second neural axis by the mouse node. Development <u>120</u>, 613–620
- Beggah AT, Béguin P, Bamberg K, Sachs G, Geering K (1999): β-Subunit Assembly Is Essential for the Correct Packing and the Stable Membrane Insertion of the H,K-ATPase α-Subunit. J Biol Chem <u>274</u>, 8217–8223
- Beil W, Hackbarth I, Sewing K-F (1986): Mechanism of gastric antisecretory effect of SCH 28080. Br J Pharmacol <u>88</u>, 19–23
- Bellairs R, Osmond M: Atlas of Chick Development. 3. Auflage; Academic Press, Amsterdam 2014
- Bertocchini F, Stern CD (2002): The Hypoblast of the Chick Embryo Positions the Primitive Streak by Antagonizing Nodal Signaling. Dev Cell <u>3</u>, 735–744
- Bessodes N, Haillot E, Duboc V, Röttinger E, Lahaye F, Lepage T (2012): Reciprocal Signaling between the Ectoderm and a Mesendodermal Left-Right Organizer Directs Left-Right Determination in the Sea Urchin Embryo. PLOS Genet <u>8</u>, e1003121
- Beyer T, Thumberger T, Schweickert A, Blum M (2012a): Connexin26-mediated transfer of laterality cues in Xenopus. Biol Open <u>1</u>, 473–481
- Beyer T, Danilchik M, Thumberger T, Vick P, Tisler M, Schneider I, Bogusch S, Andre P, Ulmer B, Walentek P, et al. (2012b): Serotonin Signaling Is Required for Wnt-Dependent GRP Specification and Leftward Flow in Xenopus. Curr Biol <u>22</u>, 33–39
- Billings PC, Yang E, Mundy C, Pacifici M (2018): Domains with highest heparan sulfate-binding affinity reside at opposite ends in BMP2/4 versus BMP5/6/7: Implications for function. J Biol Chem <u>293</u>, 14371–14383
- Blatt EN, Yan XH, Wuerffel MK, Hamilos DL, Brody SL (1999): Forkhead Transcription Factor HFH-4 Expression Is Temporally Related to Ciliogenesis. Am J Respir Cell Mol Biol <u>21</u>, 168–176
- Blum M, Andre P, Muders K, Schweickert A, Fischer A, Bitzer E, Bogusch S, Beyer T, van Straaten HWM, Viebahn C (2007): Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. Differentiation <u>75</u>, 133–146
- Blum M, Schweickert A, Vick P, Wright CVE, Danilchik MV (2014a): Symmetry breakage in the vertebrate embryo: when does it happen and how does it work? Dev Biol <u>393</u>, 109–123
- Blum M, Feistel K, Thumberger T, Schweickert A (2014b): The evolution and conservation of leftright patterning mechanisms. Development <u>141</u>, 1603–1613
- Boettger T, Knoetgen H, Wittler L, Kessel M (2003): The avian organizer. Int J Dev Biol <u>45</u>, 281– 287
- Bornemann DJ, Duncan JE, Staatz W, Selleck S, Warrior R (2004): Abrogation of heparan sulfate synthesis in Drosophila disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. Development <u>131</u>, 1927–1938
- Boskovski MT, Yuan S, Pedersen NB, Goth CK, Makova S, Clausen H, Brueckner M, Khokha MK (2013): The Heterotaxy gene, GALNT11, glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality. Nature 504, 456–459
- Bowers PN, Brueckner M, Yost HJ (1996): Laterality disturbances. Prog Pediatr Cardiol 6, 53-62
- Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH (1995): Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. N Engl J Med <u>332</u>, 1323–1329
- Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song S-K, Shapiro SD (2000): Ciliogenesis and Left–Right Axis Defects in Forkhead Factor HFH-4–Null Mice. Am J Respir Cell Mol Biol <u>23</u>, 45–51
- Brown NA, Wolpert L (1990): The development of handedness in left/right asymmetry. Development <u>109</u>, 1–9
- Brummett AR, Dumont JN (1978): Kupffer's vesicle in Fundulus heteroclitus: A scanning and transmission electron microscope study. Tissue Cell <u>10</u>, 11–22

- Burn SF, Hill RE (2009): Left-right asymmetry in gut development: what happens next? BioEssays <u>31</u>, 1026–1037
- Candiello J, Balasubramani M, Schreiber EM, Cole GJ, Mayer U, Halfter W, Lin H (2007): Biomechanical properties of native basement membranes. FEBS J <u>274</u>, 2897–2908
- Carneiro K, Donnet C, Rejtar T, Karger BL, Barisone GA, Díaz E, Kortagere S, Lemire JM, Levin M (2011): Histone deacetylase activity is necessary for left-right patterning during vertebrate development. BMC Dev Biol <u>11</u>, 29
- Caron A, Xu X, Lin X (2012): Wnt/β-catenin signaling directly regulates Foxj1 expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle. Development <u>139</u>, 514–524
- Carpaij M: Cell Arrangement, N-cadherin Distribution and Emerging Left-Right Asymmetry in the Hensen's Node of the Chick Embryo. Biol. Bachelorarbeit. Göttingen 2014
- Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A (2001): Improved method for chick wholeembryo culture using a filter paper carrier. Dev Dyn <u>220</u>, 284–289
- Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A (2002): Analysis of Spatial and Temporal Gene Expression Patterns in Blastula and Gastrula Stage Chick Embryos. Dev Biol <u>245</u>, 187–199
- Chea HK, Wright CV, Swalla BJ (2005): Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. Dev Dyn <u>234</u>, 269–278
- Chen C, Shen MM (2004): Two Modes by which Lefty Proteins Inhibit Nodal Signaling. Curr Biol <u>14</u>, 618–624
- Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP (1998): Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. J Clin Invest <u>102</u>, 1077–1082
- Choksi SP, Lauter G, Swoboda P, Roy S (2014): Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. Development <u>141</u>, 1427–1441
- Christian JL (2012): Morphogen gradients in Development: from form to function. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol <u>1</u>, 3–15
- Claeys D, Saraga E, Rossier BC, Kraehenbuhl JP (1997): Neonatal injection of native proton pump antigens induces autoimmune gastritis in mice. Gastroenterology <u>113</u>, 1136–1145
- Cooke J (2004): The evolutionary origins and significance of vertebrate left–right organisation. BioEssays <u>26</u>, 413–421
- Critchley DR, England MA, Wakely J, Hynes RO (1979): Distribution of fibronectin in the ectoderm of gastrulating chick embryos. Nature <u>280</u>, 498
- Cruz C, Ribes V, Kutejova E, Cayuso J, Lawson V, Norris D, Stevens J, Davey M, Blight K, Bangs F, et al. (2010): Foxj1 regulates floor plate cilia architecture and modifies the response of cells to sonic hedgehog signalling. Development <u>137</u>, 4271–4282
- Danilchik MV, Brown EE, Riegert K (2006): Intrinsic chiral properties of the Xenopus egg cortex: an early indicator of left-right asymmetry? Development <u>133</u>, 4517–4526
- Dathe V, Gamel A, Männer J, Brand-Saberi 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

- Davey MG, Paton IR, Yin Y, Schmidt M, Bangs FK, Morrice DR, Smith TG, Buxton P, Stamataki D, Tanaka M, et al. (2006): The chicken talpid3 gene encodes novel protein essential for Hedgehog signaling. Genes Dev 20, 1365–1377
- Davis NM, Kurpios NA, Sun X, Gros J, Martin JF, Tabin CJ (2008): The Chirality of Gut Rotation Derives from Left-Right Asymmetric Changes in the Architecture of the Dorsal Mesentery. Dev Cell <u>15</u>, 134–145
- D'ortho M-P, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G (1997): Membrane-Type Matrix Metalloproteinases 1 and 2 Exhibit Broad-Spectrum Proteolytic Capacities Comparable to Many Matrix Metalloproteinases. Eur J Biochem <u>250</u>, 751–757
- Duboc V, Röttinger E, Lapraz F, Besnardeau L, Lepage T (2005): Left-Right Asymmetry in the Sea Urchin Embryo Is Regulated by Nodal Signaling on the Right Side. Dev Cell <u>9</u>, 147–158
- Durdu S, Iskar M, Revenu C, Schieber N, Kunze A, Bork P, Schwab Y, Gilmour D (2014): Luminal signalling links cell communication to tissue architecture during organogenesis. Nature 515, 120–124
- Ene MD, Khan-Daneshmend T, Roberts CJ (1982): A study of the inhibitory effects of SCH 28080 on gastric secretion in man. Br J Pharmacol <u>76</u>, 389–391
- England MA, Wakely J (1977): Scanning electron microscopy of the development of the mesoderm layer in chick embryos. Anat Embryol (Berl) <u>150</u>, 291–300
- Epps DE, Wolfe ML, Groppi V (1994): Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. Chem Phys Lipids <u>69</u>, 137–150
- Essner JJ, Vogan KJ, Wagner MK, Tabin CJ, Yost HJ, Brueckner M (2002): Left–right development: Conserved function for embryonic nodal cilia. Nature <u>418</u>, 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 <u>132</u>, 1247–1260
- Eyal-Giladi H, Kochav S (1976): From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. Dev Biol <u>49</u>, 321–337
- Eyal-Giladi H, Debby A, Harel N (1992): The posterior section of the chick's area pellucida and its involvement in hypoblast and primitive streak formation. Development <u>116</u>, 819–830
- Faber J, Nieuwkoop PD (Hrsg.): Normal Table of Xenopus Laevis. Routledge, New York 1994
- Fellenius E, Berglindh T, Sachs G, Olbe L, Elander B, Sjöstrand S-E, Wallmark B (1981): Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H + + K +) ATPase. Nature <u>290</u>, 159
- Forge A, Jagger DJ, Kelly JJ, Taylor RR (2013): Connexin30-mediated intercellular communication plays an essential role in epithelial repair in the cochlea. J Cell Sci <u>126</u>, 1703–1712
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985): Formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem 33, 845–853

- Franco D, Christoffels VM, Campione M (2014): Homeobox transcription factor Pitx2: The rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis. Trends Cardiovasc Med <u>24</u>, 23– 31
- Franco D, Sedmera D, Lozano-Velasco E (2017): Multiple Roles of Pitx2 in Cardiac Development and Disease. J Cardiovasc Dev Dis <u>4</u>, 16
- Fujita A, Horio Y, Higashi K, Mouri T, Hata F, Takeguchi N, Kurachi Y (2002): Specific localization of an inwardly rectifying K+ channel, Kir4.1, at the apical membrane of rat gastric parietal cells; its possible involvement in K+ recycling for the H+–K+-pump. J Physiol <u>540</u>, 85–92
- Fukumoto T, Kema IP, Levin M (2005a): Serotonin Signaling Is a Very Early Step in Patterning of the Left-Right Axis in Chick and Frog Embryos. Curr Biol <u>15</u>, 794–803
- Fukumoto T, Blakely R, Levin M (2005b): Serotonin Transporter Function Is an Early Step in Left-Right Patterning in Chick and Frog Embryos. Dev Neurosci <u>27</u>, 349–363
- Garcia-Castro MI, Vielmetter E, Bronner-Fraser M (2000): N-Cadherin, a Cell Adhesion Molecule Involved in Establishment of Embryonic Left-Right Asymmetry. Science <u>288</u>, 1047–1051
- Geisha. http://geisha.arizona.edu/geisha/search.jsp?entrez_gene=468038; Zugriff am 18.03.2019
- Gilbert SF: Developmental Biology. 6. Auflage; Sinauer Associates, Sunderland 2000
- González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF (2001): Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca2+-permeable nonselective cation channel. Proc Natl Acad Sci USA <u>98</u>, 1182–1187
- Grande C, Patel NH (2009): Nodal signaling is involved in left-right asymmetry in snails. Nature <u>457</u>, 1007–1011
- Grande C, Martín-Durán JM, Kenny NJ, Truchado-García M, Hejnol A (2015): Evolution, divergence and loss of the Nodal signalling pathway: new data and a synthesis across the Bilateria. Int J Dev Biol <u>58</u>, 521–532
- 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 <u>324</u>, 941–944
- Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Cain BD, Wingo CS (2009): The renal H+-K+-ATPases: physiology, regulation, and structure. Am J Physiol-Ren Physiol <u>298</u>, F12–F21
- Guthrie S, Turin L, Warner A (1988): Patterns of junctional communication during development of the early amphibian embryo. Development <u>103</u>, 769–783
- Haeckel E (1874): Die Gastraea-Theorie, die phylogenetische Classification des Thierreichs und die Homologie der Keimblätter. Jenaische Z Naturwiss <u>8</u>, 1–55
- Hagenlocher C, Walentek P, Müller C, Thumberger T, Feistel K (2013): Ciliogenesis and cerebrospinal fluid flow in the developing Xenopus brain are regulated by foxj1. Cilia <u>2</u>, 12
- Hahnel AC, Eddy EM (1987): The distribution of two cell surface determinants of mouse embryonal carcinoma and early embryonic cells. J Reprod Immunol <u>10</u>, 89–110
- Hamburger V, Hamilton HL (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol <u>88</u>, 49–92

- Han C, Belenkaya TY, Wang B, Lin X (2004): Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. Development <u>131</u>, 601–611
- Han C, Yan D, Belenkaya TY, Lin X (2005): Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. Development <u>132</u>, 667–679
- Hashimoto M, Shinohara K, Wang J, Ikeuchi S, Yoshiba S, Meno C, Nonaka S, Takada S, Hatta K, Wynshaw-Boris A, Hamada H (2010): Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. Nat Cell Biol <u>12</u>, 170–176
- Hassoun R, Schwartz P, Feistel K, Blum M, Viebahn C (2009): Axial differentiation and early gastrulation stages of the pig embryo. Differentiation <u>78</u>, 301–311
- Hatta K, Takeichi M (1986): Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. Nature <u>320</u>, 447
- Hensen V (1876): Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens and Meerschweinchens. Zool Anat Entwickl Gesch <u>1</u>, 213–273, 353–423
- Herold G: Innere Medizin 2016. Herold, Köln 2015
- Hibino T, Ishii Y, Levin M, Nishino A (2006): Ion flow regulates left–right asymmetry in sea urchin development. Dev Genes Evol <u>216</u>, 265
- Izpisúa-Belmonte JC, De Robertis EM, Storey KG, Stern CD (1993): The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. Cell <u>74</u>, 645–659
- Jacob HJ, Christ B, Jacob M, Bijvank GJ (1974): Scanning electron microscope (SEM) studies on the epiblast of young chick embryos. Z Anat Entwicklungsgeschichte <u>143</u>, 205–214
- Jacob M, Christ B, Jacob HJ, Poelmann RE (1991): The role of fibronectin and laminin in development and migration of the avian Wolffian duct with reference to somitogenesis. Anat Embryol (Berl) <u>183</u>, 385–395
- Johnson RL, Riddle RD, Laufer E, Tabin C (1994): Sonic hedgehog: a key mediator of anteriorposterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. Biochem Soc Trans <u>22</u>, 569–574
- Joshi R, Goihberg E, Ren W, Pilichowska M, Mathew P (2017): Proteolytic fragments of fibronectin function as matrikines driving the chemotactic affinity of prostate cancer cells to human bone marrow mesenchymal stromal cells via the α5β1 integrin. Cell Adhes Migr <u>11</u>, 305–315
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest <u>119</u>, 1420–1428
- Kathem SH, Mohieldin AM, Nauli SM (2014): The Roles of Primary cilia in Polycystic Kidney Disease. AIMS Mol Sci <u>1</u>, 27–46
- Kawakami Y, Raya Á, Raya RM, Rodríguez-Esteban C, Belmonte JCI (2005): Retinoic acid signalling links left–right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. Nature <u>435</u>, 165
- Keeling DJ, Laing SM, Senn-Bilfinger J (1988): SCH 28080 is a lumenally acting, K+-site inhibitor of the gastric (H+ + K+)-ATPase. Biochem Pharmacol <u>37</u>, 2231–2236
- Keller R, Clark Jr. WH, Griffin F (Hrsg.): Gastrulation: Movements, Patterns and Molecules (Bodega Marine Laboratory Marine Science Series). Springer, New York 1991

King AS, McLelland J (Hrsg.): Form and function in birds. Academic Press, London 1979

- Kölliker A: Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere. W. Engelmann, Leipzig 1879
- Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF, Drummond IA (2005): Ciliadriven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. Development <u>132</u>, 1907–1921
- Kremnyov S, Henningfeld K, Viebahn C, Tsikolia N (2018): Divergent axial morphogenesis and early shh expression in vertebrate prospective floor plate. EvoDevo <u>9</u>, 4
- Krieg L, Milstein O, Krebs P, Xia Y, Beutler B, Du X (2011): Mutation of the gastric hydrogenpotassium ATPase alpha subunit causes iron-deficiency anemia in mice. Blood <u>118</u>, 6418– 6425
- Kurpios NA, Ibañes M, Davis NM, Lui W, Katz T, Martin JF, Belmonte JCI, Tabin CJ (2008): The direction of gut looping is established by changes in the extracellular matrix and in cell:cell adhesion. Proc Natl Acad Sci USA <u>105</u>, 8499–8506
- Lambrecht NWG, Yakubov I, Scott D, Sachs G (2005): Identification of the K efflux channel coupled to the gastric H-K-ATPase during acid secretion. Physiol Genomics <u>21</u>, 81–91
- Lawson A, Schoenwolf GC (2003): Epiblast and primitive-streak origins of the endoderm in the gastrulating chick embryo. Development <u>130</u>, 3491–3501
- Lefcort F, Venstrom K, McDonald JA, Reichardt LF (1992): Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. Development <u>116</u>, 767–782
- Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA (2009): Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. Genet Med <u>11</u>, 473–487
- Levin M, Mercola M (1999): Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of Shh asymmetry in the node. Development <u>126</u>, 4703–4714
- Levin M, Palmer AR (2007): Left–right patterning from the inside out: Widespread evidence for intracellular control. BioEssays <u>29</u>, 271–287
- Levin M, Johnson RL, Sterna CD, Kuehn M, Tabin C (1995): A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. Cell <u>82</u>, 803–814
- Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, Mercola M (2002): Asymmetries in H+/K+-ATPase and Cell Membrane Potentials Comprise a Very Early Step in Left-Right Patterning. Cell <u>111</u>, 77–89
- Li G, Liu X, Xing C, Zhang H, Shimeld SM, Wang Y (2017): Cerberus–Nodal–Lefty–Pitx signaling cascade controls left–right asymmetry in amphioxus. Proc Natl Acad Sci USA <u>114</u>, 3684– 3689
- Lin AE, Krikov S, Riehle-Colarusso T, Frías JL, Belmont J, Anderka M, Geva T, Getz KD, Botto LD (2014): Laterality defects in the national birth defects prevention study (1998–2007): Birth prevalence and descriptive epidemiology. Am J Med Genet A <u>164</u>, 2581–2591

- Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisúa-Belmonte JC, Rosenfeld MG (1999): Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. Nature <u>401</u>, 279
- Logan M, Pagán-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 <u>94</u>, 307–317
- Loo B-M, Salmivirta M (2002): Heparin/Heparan Sulfate Domains in Binding and Signaling of Fibroblast Growth Factor 8b. J Biol Chem <u>277</u>, 32616–32623
- Lopez-Sanchez C, Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC (2001): Localization of Cells of the Prospective Neural Plate, Heart and Somites within the Primitive Streak and Epiblast of Avian Embryos at Intermediate Primitive-Streak Stages. Cells Tissues Organs <u>169</u>, 334–346
- Lopez-Sanchez C, Puelles L, Garcia-Martinez V, Rodriguez-Gallardo L (2005): Morphological and molecular analysis of the early developing chick requires an expanded series of primitive streak stages. J Morphol <u>264</u>, 105–116
- Lorentzon P, Jackson R, Wallmark B, Sachs G (1987): Inhibition of (H+ + K+)-ATPase by omeprazole in isolated gastric vesicles requires proton transport. Biochim Biophys Acta 897, 41–51
- Low FN (1970): Interstitial bodies in the early chick embryo. Am J Anat 128, 45-55
- Maeda M, Ishizaki J, Futai M (1988): cDNA cloning and sequence determination of pig gastric (H+ + K+)-ATPase. Biochem Biophys Res Commun <u>157</u>, 203–209
- Maeda M, Oshiman K, Tamura S, Futai M (1990): Human gastric (H+ + K+)-ATPase gene. Similarity to (Na+ + K+)-ATPase genes in exon/intron organization but difference in control region. J Biol Chem <u>265</u>, 9027–9032
- Männer J (2001): Does an equivalent of the "ventral node" exist in chick embryos? A scanning electron microscopic study. Anat Embryol (Berl) <u>203</u>, 481–490
- Marjoram L, Wright C (2011): Rapid differential transport of Nodal and Lefty on sulfated proteoglycan-rich extracellular matrix regulates left-right asymmetry in Xenopus. Development <u>138</u>, 475–485
- McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003): Two Populations of Node Monocilia Initiate Left-Right Asymmetry in the Mouse. Cell <u>114</u>, 61–73
- Meier S (1979): Development of the chick embryo mesoblast: Formation of the embryonic axis and establishment of the metameric pattern. Dev Biol <u>73</u>, 25–45
- Mendes RV, Martins GG, Cristovão AM, Saúde L (2014): N-Cadherin Locks Left-Right Asymmetry by Ending the Leftward Movement of Hensen's Node Cells. Dev Cell <u>30</u>, 353– 360
- Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M, Toyoda Y, Hamada H (1996): Left–right asymmetric expression of the TGFβ-family member lefty in mouse embryos. Nature <u>381</u>, 151
- Molina MD, de Crozé N, Haillot E, Lepage T (2013): Nodal: master and commander of the dorsalventral and left-right axes in the sea urchin embryo. Curr Opin Genet Dev 23, 445–453

- Morokuma J, Blackiston D, Levin M (2008): KCNQ1 and KCNE1 K+ Channel Components are Involved in Early Left-Right Patterning in Xenopus laevis Embryos. Cell Physiol Biochem 21, 357–372
- Mukherjee T, Mandal D, Bhaduri A (2001): Leishmania plasma membrane Mg2+-ATPase is a H+/K+-antiporter involved in glucose symport. Studies with sealed ghosts and vesicles of opposite polarity. J Biol Chem <u>276</u>, 5563–5569
- Nagai H, Mak S-S, Weng W, Nakaya Y, Ladher R, Sheng G (2011): Embryonic development of the emu, Dromaius novaehollandiae. Dev Dyn <u>240</u>, 162–175
- Naganathan SR, Fürthauer S, Nishikawa M, Jülicher F, Grill SW (2014): Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left–right symmetry breaking. eLife <u>3</u>, e04165
- Nakamura T, Hamada H (2012): Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms. Development <u>139</u>, 3257–3262
- Nakaya Y, Sheng G (2009): An amicable separation. Cell Adhes Migr 3, 160-163
- Nakaya Y, Sheng G (2013): EMT in developmental morphogenesis. Cancer Lett 341, 9-15
- Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G (2008): RhoA and microtubule dynamics control cellbasement membrane interaction in EMT during gastrulation. Nat Cell Biol <u>10</u>, 765–775
- New DAT (1955): A New Technique for the Cultivation of the Chick Embryo in vitro. Development <u>3</u>, 326–331
- Newgreen D, Thiery J-P (1980): Fibronectin in early avian embryos: Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. Cell Tissue Res <u>211</u>, 269–291
- Nicolet G (1970): An autoradiographic study of the presumptive fate of the primitive streak in chick embryos. J Embryol Exp Morphol <u>23</u>, 70–108
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N (1998): Randomization of Left–Right Asymmetry due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein. Cell <u>95</u>, 829–837
- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H (2002): Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. Nature <u>418</u>, 96–99
- Norris DP (2012): Cilia, calcium and the basis of left-right asymmetry. BMC Biol 10, 102
- Nüsslein-Volhard C (1977): Genetic analysis of pattern-formation in the embryo of Drosophila melanogaster: Characterization of the maternal-effect mutant Bicaudal. Wilhelm Rouxs Arch Dev Biol <u>183</u>, 249–268
- Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, Belmonte J-CI, Hirokawa N (2005): Mechanism of Nodal Flow: A Conserved Symmetry Breaking Event in Left-Right Axis Determination. Cell <u>121</u>, 633–644
- Otto A, Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N (2014): Early left-right asymmetries during axial morphogenesis in the chick embryo. Genesesis 2000 <u>52</u>, 614–625
- Pagán-Westphal SM, Tabin CJ (1998): The Transfer of Left-Right Positional Information during Chick Embryogenesis. Cell <u>93</u>, 25–35

Pander: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Hühnchens im Eye. Brönner, Frankfurt a.M. 1817

- Park Y, Rangel C, Reynolds MM, Caldwell MC, Johns M, Nayak M, Welsh CJR, McDermott S, Datta S (2003): Drosophila Perlecan modulates FGF and Hedgehog signals to activate neural stem cell division. Dev Biol <u>253</u>, 247–257
- Pasteels J (1937): Etudes sur la gastrulation des vertebres meroblastiques. III. Oiseaux. IV Conclusions generales. Arch Biol <u>48</u>, 381–488
- Peeters H, Devriendt K (2006): Human laterality disorders. Eur J Med Genet 49, 349-362
- Pieper T, Carpaij M, Reinermann J, Surchev L, Viebahn C, Tsikolia N (2019): Matrix-filled microcavities in the emerging avian left-right organizer. Dev Dyn (im Druck)
- Plöger R, Viebahn C (2018): Pitx2 and nodal as conserved early markers of the anterior-posterior axis in the rabbit embryo. Ann Anat <u>218</u>, 256–264
- Plouhinec J-L, Zakin L, Moriyama Y, De Robertis EM (2013): Chordin forms a self-organizing morphogen gradient in the extracellular space between ectoderm and mesoderm in the Xenopus embryo. Proc Natl Acad Sci USA <u>110</u>, 20372–20379
- Psychoyos D, Stern CD (1996): Restoration of the organizer after radical ablation of Hensen's node and the anterior primitive streak in the chick embryo. Development <u>122</u>, 3263–3273
- Qiu D, Cheng S-M, Wozniak L, McSweeney M, Perrone E, Levin M (2005): Localization and lossof-function implicates ciliary proteins in early, cytoplasmic roles in left-right asymmetry. Dev Dyn <u>234</u>, 176–189
- Rabl C: Theorie des Mesoderms. W. Engelmann, Leipzig 1897
- Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M, Wijelath ES (2005): Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. BMC Cell Biol <u>6</u>, 8
- Raman R, Al-Ali SY, Poole CA, Dawson BV, Carman JB, Calder L (2003): Isomerism of the right atrial appendages: clinical, anatomical, and microscopic study of a long-surviving case with asplenia and ciliary abnormalities. Clin Anat <u>16</u>, 269–276
- Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960): Embedding in Epoxy Resins for Ultrathin Sectioning in Electron Microscopy. Stain Technol <u>35</u>, 313–323
- Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA (2013): Functions and mechanics of dynein motor proteins. Nat Rev Mol Cell Biol <u>14</u>, 713–726
- Rosenquist GC (1966): A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm. Development from primitive-streak stages to stage 12. Contrib Embryol <u>38</u>, 71–110
- Rosenquist GC (1972): Endoderm movements in the chick embryo between the early short streak and head process stages. J Exp Zool <u>180</u>, 95–103
- Rosenquist GC (1983): The chorda center in Hensen's node of the chick embryo. Anat Rec 207, 349–355
- Roussigné M, Blader P, Wilson SW (2012): Breaking symmetry: The zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain. Dev Neurobiol <u>72</u>, 269–281
- Rozbicki E, Chuai M, Karjalainen AI, Song F, Sang HM, Martin R, Knölker H-J, MacDonald MP, Weijer CJ (2015): Myosin-II-mediated cell shape changes and cell intercalation contribute to primitive streak formation. Nat Cell Biol <u>17</u>, 397–408

- Ruiz i Altaba A, Placzek M, Baldassare M, Dodd J, Jessell TM (1995): Early Stages of Notochord and Floor Plate Development in the Chick Embryo Defined by Normal and Induced Expression of HNF-3β. Dev Biol <u>170</u>, 299–313
- Rulle A, Tsikolia N, de Bakker B, Drummer C, Behr R, Viebahn C (2018): On the Enigma of the Human Neurenteric Canal. CTO <u>205</u>, 1–23
- Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, de la Peña J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, et al. (1998): Pitx2 determines left–right asymmetry of internal organs in vertebrates. Nature <u>394</u>, 545–551
- Sachs G, Chang HH, Rabon E, Schackman R, Lewin M, Saccomani G (1976): A nonelectrogenic H+ pump in plasma membranes of hog stomach. J Biol Chem <u>251</u>, 7690–7698
- Sachs G, Shin JM, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I, Munson K (2007): The Gastric H,K ATPase as a Drug Target. J Clin Gastroenterol <u>41</u>, 226–242
- Sáenz-Ponce N, Santillana-Ortiz J-D, del Pino EM (2012): The gastrocoel roof plate in embryos of different frogs. Differentiation <u>83</u>, 862–866
- Saijoh Y, Oki S, Tanaka C, Nakamura T, Adachi H, Yan Y-T, Shen MM, Hamada H (2005): Two nodal-responsive enhancers control left–right asymmetric expression of Nodal. Dev Dyn 232, 1031–1036
- Sanders EJ (1982): Ultrastructural immunocytochemical localization of fibronectin in the early chick embryo. Development <u>71</u>, 155–170
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, De Robertis EM (1994): Xenopus chordin: A Novel Dorsalizing Factor Activated by Organizer-Specific Homeobox Genes. Cell <u>79</u>, 779–790
- Sato K, Hiraiwa T, Maekawa E, Isomura A, Shibata T, Kuranaga E (2015): Left–right asymmetric cell intercalation drives directional collective cell movement in epithelial morphogenesis. Nat Commun <u>6</u>, 10074
- Sauer S, Klar AJS (2012): Left-right symmetry breaking in mice by left-right dynein may occur via a biased chromatid segregation mechanism, without directly involving the Nodal gene. Front Oncol <u>2</u>, 166
- Scanes CG: Sturkie's Avian Physiology. 6. Auflage; Academic Press, London 2014
- Schoenwolf GC, Garcia-Martinez V, Dias MS (1992): Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. Dev Dyn <u>193</u>, 235–248
- Schröder SS: Zur Rolle der Chorda dorsalis und der Funktion der Dyneine bei der molekularen Rechts-Links-Differenzierung des Säugers. Med. Diss. Göttingen 2017
- Schwartz P, Piper H, Spahr R, Spieckermann P (1984): Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation. Am J Pathol <u>115</u>, 349–61
- Schweickert A, Weber T, Beyer T, Vick P, Bogusch S, Feistel K, Blum M (2007): Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in Xenopus. Curr Biol <u>17</u>, 60–66
- Schweickert A, Vick P, Getwan M, Weber T, Schneider I, Eberhardt M, Beyer T, Pachur A, Blum M (2010): The Nodal Inhibitor Coco Is a Critical Target of Leftward Flow in Xenopus. Curr Biol <u>20</u>, 738–743

- Seidl W (1977): Description of a device facilitating the in vitro culture of chick embryo according to the new method. Folia Morphol <u>25</u>, 43–45
- Seifert R, Jacob M, Jacob HJ (1993): The avian prechordal head region: a morphological study. J Anat <u>183</u>, 75–89
- Selleck MA, Stern CD (1991): Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. Development <u>112</u>, 615–626
- Shimeld SM, Levin M (2006): Evidence for the regulation of left-right asymmetry in Ciona intestinalis by ion flux. Dev Dyn <u>235</u>, 1543–1553
- Shin JM, Munson K, Vagin O, Sachs G (2009): The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. Pflugers Arch <u>457</u>, 609–622
- Shinohara K, Kawasumi A, Takamatsu A, Yoshiba S, Botilde Y, Motoyama N, Reith W, Durand B, Shiratori H, Hamada H (2012): Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left–right symmetry in the mouse embryo. Nat Commun <u>3</u>, 622
- Shiraishi I, Ichikawa H (2012): Human Heterotaxy Syndrome. Circ J 76, 2066–2075
- Shiratori H, Sakuma R, Watanabe M, Hashiguchi H, Mochida K, Sakai Y, Nishino J, Saijoh Y, Whitman M, Hamada H (2001): Two-Step Regulation of Left–Right Asymmetric Expression of Pitx2: Initiation by Nodal Signaling and Maintenance by Nkx2. Mol Cell <u>7</u>, 137–149
- Shiratori H, Yashiro K, Shen MM, Hamada H (2006): Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. Development <u>133</u>, 3015–3025
- Shook DR, Majer C, Keller R (2004): Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, Xenopus laevis and Xenopus tropicalis. Dev Biol <u>270</u>, 163–185
- Shull GE, Lingrel JB (1986): Molecular cloning of the rat stomach (H+ + K+)-ATPase. J Biol Chem <u>261</u>, 16788–16791
- Smith SM-L, West LA, Govindraj P, Zhang X, Ornitz DM, Hassell JR (2007): Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF-2 to FGF receptors. Matrix Biol <u>26</u>, 175–184
- Smith WC, Harland RM (1992): Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. Cell <u>70</u>, 829–840
- 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 <u>466</u>, 378–382
- Sotelo JR, Trujillo-Cenóz O (1958): Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. Z Zellforsch Mikrosk Anat <u>49</u>, 1–12
- Spemann H, Mangold H (1924): Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. Arch Mikrosk Anat Entwickl Mech <u>100</u>, 599–638
- Spicer Z, Miller ML, Andringa A, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Shull GE (2000): Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha -subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. J Biol Chem <u>275</u>, 21555–21565

- Spratt NT (1947): Regression and shortening of the primitive streak in the explanted chick blastoderm. J Exp Zool <u>104</u>, 69–100
- Stalsberg H (1969): The origin of heart asymmetry: Right and left contributions to the early chick embryo heart. Dev Biol <u>19</u>, 109–127
- Stauber M, Weidemann M, Dittrich-Breiholz O, Lobschat K, Alten L, Mai M, Beckers A, Kracht M, Gossler A (2017): Identification of FOXJ1 effectors during ciliogenesis in the foetal respiratory epithelium and embryonic left-right organiser of the mouse. Dev Biol <u>423</u>, 170–188
- Stephen LA, Johnson EJ, Davis GM, McTeir L, Pinkham J, Jaberi N, Davey MG (2014): The chicken left right organizer has nonmotile cilia which are lost in a stage-dependent manner in the talpid3 ciliopathy. Genesis <u>52</u>, 600–613
- Stern C (Hrsg.): Gastrulation: From Cells to Embryo. 1. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2004
- Stern CD (2018): Staging tables for avian embryos: a little history. Int J Dev Biol 62, 43-48
- Streit A, Stern CD (1999): Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. Mech Dev <u>82</u>, 51–66
- Streit A, Stern CD (2008): Operations on primitive streak stage avian embryos. Methods Cell Biol <u>87</u>, 3–17
- Stubbs JL, Oishi I, Izpisúa Belmonte JC, Kintner C (2008): The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in Xenopus and zebrafish embryos. Nat Genet <u>40</u>, 1454–1460
- Sugano K (2018): Vonoprazan fumarate, a novel potassium-competitive acid blocker, in the management of gastroesophageal reflux disease: safety and clinical evidence to date. Ther Adv Gastroenterol <u>11</u>, 1756283X17745776
- Sulik K, Dehart DB, Inagaki T, Carson JL, Vrablic T, Gesteland K, Schoenwolf GC (1994): Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. Dev Dyn <u>201</u>, 260–278
- Supp DM, Witte DP, Potter SS, Brueckner M (1997): Mutation of an axonemal dynein affects leftright asymmetry in *inversus viscerum* mice. Nature <u>389</u>, 963–966
- Sutherland MJ, Ware SM (2009): Disorders of left–right asymmetry: Heterotaxy and situs inversus. Am J Med Genet C Semin Med Genet <u>151C</u>, 307–317
- Sydow H-G, Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N: An Early Chick Embryo Culture Device for Extended Continuous Observation. In: Sheng G (Hrsg.): Avian and Reptilian Developmental Biology: Methods and Protocols. Springer New York, New York 2017, 309–317
- Tabin CJ (2006): The Key to Left-Right Asymmetry. Cell 127, 27-32
- Tabin CJ (2011): Establishing Robust Left-Right Asymmetry in the Vertebrate Embryo. Dev Cell <u>20</u>, e2
- Tabin CJ, Vogan KJ (2003): A two-cilia model for vertebrate left-right axis specification. Genes Dev <u>17</u>, 1–6
- Taipale J, Saharinen J, Hedman K, Keski-Oja J (1996): Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. J Histochem Cytochem <u>44</u>, 875–889

- Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N (2005): FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left–right determination. Nature <u>435</u>, 172– 177
- Thisse C, Thisse B (1999): Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. Development <u>126</u>, 229–240
- 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 <u>84</u>, 380–391
- Tynan MJ, Becker AE, Macartney FJ, Jiménez MQ, Shinebourne EA, Anderson RH (1979): Nomenclature and classification of congenital heart disease. Heart <u>41</u>, 544–553
- Vagin O, Turdikulova S, Sachs G (2004): The H,K-ATPase β Subunit as a Model to Study the Role of N-Glycosylation in Membrane Trafficking and Apical Sorting. J Biol Chem <u>279</u>, 39026–39034
- Vagin O, Turdikulova S, Yakubov I, Sachs G (2005): Use of the H,K-ATPase β Subunit to Identify Multiple Sorting Pathways for Plasma Membrane Delivery in Polarized Cells. J Biol Chem 280, 14741–14754
- Vandenberg LN, Levin M (2010): Far from solved: A perspective on what we know about early mechanisms of left–right asymmetry. Dev Dyn <u>239</u>, 3131–3146
- Vandenberg LN, Levin M (2013): A unified model for left-right asymmetry? Comparison and synthesis of molecular models of embryonic laterality. Dev Biol <u>379</u>, 1–15
- 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 <u>331</u>, 281–291
- Viebahn C (2001): Hensen's node. Genesis 29, 96-103
- Voiculescu O, Papanayotou C, Stern CD (2008): Spatially and temporally controlled electroporation of early chick embryos. Nat Protoc <u>3</u>, 419–426
- von Baer KE: Über Entwicklungsgeschichte der Thiere. 1. Auflage; Bornträger, Königsberg 1828
- Waddington CH, Schmidt GA (1933): Induction by heteroplastic grafts of the primitive streak in birds. Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org <u>128</u>, 522–563
- Wakely J, England MA (1977): Scanning Electron Microscopy (SEM) of the Chick Embryo Primitive Streak. Differentiation 7, 181–186
- Wakely J, England MA (1978): Development of the chick embryo endoderm studied by S.E.M. Anat Embryol (Berl) <u>153</u>, 167–178
- Wakely J, England Marjorie A., Amoroso Emmanuel Ciprian (1979): Scanning electron microscopical and histochemical study of the structure and function of basement membranes in the early chick embryo. Proc R Soc Lond B Biol Sci <u>206</u>, 329–352
- Walentek P, Beyer T, Thumberger T, Schweickert A, Blum M (2012): ATP4a Is Required for Wnt-Dependent Foxj1 Expression and Leftward Flow in Xenopus Left-Right Development. Cell Rep <u>1</u>, 516–527

- Walentek P, Beyer T, Hagenlocher C, Müller C, Feistel K, Schweickert A, Harland RM, Blum M (2015): ATP4a is required for development and function of the Xenopus mucociliary epidermis – a potential model to study proton pump inhibitor-associated pneumonia. Dev Biol <u>4</u>, 22–31
- Wallingford JB (2010): Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. Curr Opin Cell Biol <u>22</u>, 597–604
- Wallmark B, Sachs G, Mårdh S, Fellenius E (1983): Inhibition of gastric (H+ + K+)-ATPase by the substituted benzimidazole, picoprazole. Biochim Biophys Acta <u>728</u>, 31–38
- 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 <u>22</u>, 405–415
- Wetzel RG: Untersuchungen am Hühnchen: Die Entwicklung des Keims während der ersten beiden Bruttage. Springer, Berlin 1929
- Wilmore HP, McClive PJ, Smith CA, Sinclair AH (2005): Expression profile of the RNA-binding protein gene hermes during chicken embryonic development. Dev Dyn <u>233</u>, 1045–1051
- Wingo CS (1989): Active proton secretion and potassium absorption in the rabbit outer medullary collecting duct. Functional evidence for proton-potassium-activated adenosine triphosphatase. J Clin Invest <u>84</u>, 361–365
- Wolpert L (1969): Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. J Theor Biol <u>25</u>, 1–47
- Yang X, Dormann D, Münsterberg AE, Weijer CJ (2002): Cell Movement Patterns during Gastrulation in the Chick Are Controlled by Positive and Negative Chemotaxis Mediated by FGF4 and FGF8. Dev Cell <u>3</u>, 425–437
- Yu X, Ng CP, Habacher H, Roy S (2008): Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. Nat Genet <u>40</u>, 1445–1453
- Zariwala MA, Knowles MR, Omran H (2007): Genetic Defects in Ciliary Structure and Function. Annu Rev Physiol <u>69</u>, 423–450
- Zhang M, Bolfing MF, Knowles HJ, Karnes H, Hackett BP (2004): Foxj1 regulates asymmetric gene expression during left–right axis patterning in mice. Biochem Biophys Res Commun 324, 1413–1420
- Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BLM, Kuehn MR (1993): Nodal is a novel TGF-β-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. Nature <u>361</u>, 543

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise auf Tagungen vorgestellt:

- Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N: The H+/K+-ATPase and left-right patterning in the chick. Joint meeting of the German and French Societies of Developmental Biologists, Nürnberg 2015 Poster
- Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N: The H+/K+-ATPase and left-right patterning in the chick. EMBO Workshop, Embryonic-Extraembryonic Interfaces, Göttingen 2015, Poster
- Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N: Gastric H+/K+-ATPase and shh signalling during left-right patterning in the chick. 110th Annual Meeting/31. Arbeitstagung of the Anatomical Society, Würzburg 2015, Poster
- Pieper T, Carpaij M, Sang H, Viebahn C, Tsikolia N: Hensen's node of the chick bears matrix filled microcavities prior to morphological node asymmetry. 111th Annual Meeting of the Anatomical Society, Göttingen 2016, Vortrag
- Pieper T, Carpaij M, Sang H, Viebahn C, Tsikolia N: Asymmetrical morphogenesis of axial mesoderm and matrix filled microcavities in Hensen's node of the chick. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, Kiel 2017, Poster
- Pieper T, Carpaij M, Sang H, Viebahn C, Tsikolia N: Asymmetrical morphogenesis and microcavities in the axial mesoderm of the chick. 18th International Congress of Developmental Biology, Singapur 2017, Poster
- Pieper T, Sydow H-G, Viebahn C, Tsikolia N: An early chick embryo culture device for studying molecular and morphological left-right patterning. Joint Meeting of the German and Israeli Societies of Developmental Biology, Wien 2019, Poster
- Pieper T, Sydow H-G, Viebahn C, Tsikolia N: A device for early chick embryo culture to study molecular and morphological left-right patterning. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria 2019, Poster
- Nordbrink RR, Pieper T, Viebahn C, Tsikolia N: On the topographic correlation of primordial germ cells and the cardiovascular anlagen in early chicken embryos. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria 2019, Poster
- Pieper T, Carpaij M, Surchev L, Viebahn C, Tsikolia N: Hensen's node of the chick bears extracellular matrix filled microcavities. XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria 2019, Vortrag

Danksagung

Zunächst gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Viebahn für die Vergabe des Themas und seine intensive Betreuung über die gesamte Zeit der Promotion. Insbesondere danke ich ihm für die Ermöglichung der Teilnahme an den vielen Fachkonferenzen, unter denen vor allem die internationale Entwicklungsbiologentagung in Singapur zu nennen ist.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer im Labor Herrn Dr. med. Nikoloz Tsikolia, der mir stets mit Rat und Tat im Labor, bei der Erarbeitung von Texten, Präsentationen und Postern sowie bei meiner Lehrtätigkeit zur Seite stand. Besonders danke ich ihm für seine freundliche, unermüdliche und außerordentlich kompetente Art, mir zu helfen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Lachezar Surchev für die gute Zusammenarbeit beim Verfassen der Publikation und für die Anregungen und Korrekturvorschläge zu meiner Dissertationsschrift bedanken.

PD Dr. med. Jörg Männer und Dr. rer. nat. Bernd Püschel danke ich für die vielen sehr hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Den technischen Mitarbeitern der Abteilung Anatomie und Embryologie danke ich besonders. Hans-Georg "Hannes" Sydow hat mir sehr viel zum Umgang mit den Embryonen beigebracht, die meisten der Semidünnschnitte angefertigt und mich bei allen Computerproblemen mit Rat und Tat unterstützt. Kirsten Falk-Stietenroth danke ich vor allem für die perfekte Durchführung der *In-situ*-Hybridisierungen und der Einbettungen in Technovit®. Heike Faust danke ich für die große Hilfe bei der Etablierung der Immunfärbungen und für die Anfertigung der Technovit®-Schnitte. Irmgard Weiß danke ich für die Hilfe bei der Einbettung der Embryonen in Araldit®.

Unseren ehemaligen Bachelorstudentinnen Meriam Carpaij, Annalena Otto und Rhea Nordbrink danke ich für die gute Zusammenarbeit. Johanna Reinermann danke ich für die Weiterarbeit an den *nodal microcavities*.

Meinen langjährigen Mitdoktoranden danke ich für die angenehme Atmosphäre im Büro.

Delia Hülsmann und Adrian Stender danke ich für die zahlreichen Korrekturvorschläge. Dr. rer. nat. Ann-Christine Gradtke und Dr. rer. nat. Maike Pelgrim danke ich für die Korrekturvorschläge auf den letzten Metern.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die Korrekturvorschläge an der Dissertationsschrift und für die fortwährende Unterstützung im Studium.