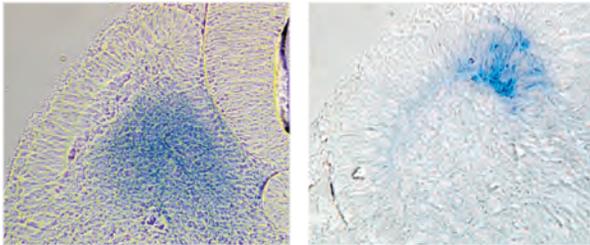
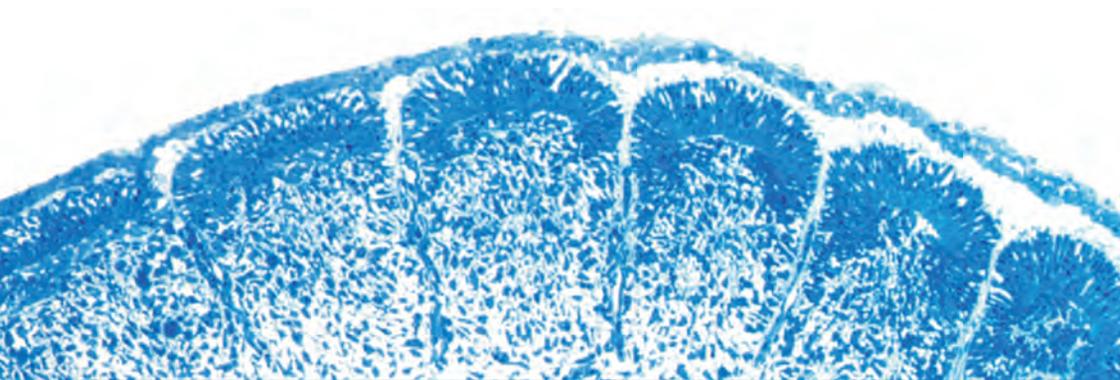


Vergleichende Untersuchungen über die Entwicklung und Kompartimentierung der sakralen und kokzygealen Somiten im Hühnerembryo

KATHRIN HEIM



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, - Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

und

Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i. Br.
Betreuer: Prof. Dr. Martin Scaal

**Vergleichende Untersuchungen über die
Entwicklung und Kompartimentierung der sakralen
und kokzygealen Somiten im Hühnerembryo**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Kathrin Heim
Tierärztin aus Baden-Baden

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig- Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Bergmann

Prof. Dr. Martin Scaal

Tag der Disputation:

21. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Gastrulation	8
1.2	Differenzierung des Mesoderms.....	10
1.2.1	Paraxiales Mesoderm	11
1.3	Segmentierung	12
1.4	Somitogenese.....	14
1.5	Kompartimente der Somiten.....	15
1.5.1	Dorsoventrale Kompartimentierung.....	16
1.5.1.1	Ventrale Somitenhälfte.....	16
1.5.1.2	Dorsale Somitenhälfte	18
1.5.2	Kraniokaudale Kompartimentierung.....	20
1.6	Die Schwanzknospe.....	20
1.7	Somitenstadien.....	22
1.7.1	Tabelle Somitenstadien	24
1.8	Wissenschaftliche Fragestellung	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Material.....	27
2.1.1	Tiere und Bebrütung.....	27
2.2	Experimente und Methoden.....	27
2.2.1	Isolierung und Einteilung in Entwicklungsstadien.....	27
2.2.2.	Semidünn-Schnitte	28
2.2.3	In situ-Hybridisierung	30
2.2.4	Immunhistochemische Färbung	32
2.3	Fotografie.....	34
2.4	Chemische Reagenzien und Zusammensetzung der Lösungen.....	34

2.4.1	Lösungen für die Präparation und Isolation der Embryonen	34
2.4.2	Lösungen für die Semidünnschnitt-Einbettung	34
2.4.3	Farblösung für die Semidünnschnitte.....	35
2.4.4	Lösungen für die Wholemout-In situ-Hybridisierung und Immunhistochemie	35
2.4.5	Lösungen für die Vibratomschnitt-Einbettung.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Ergebnisse der Semidünnschnitte	38
3.1.1	Bilder der Semidünnschnitte sagittal geschnitten	40
3.1.2	Bilder der Semidünnschnitte transversal geschnitten.....	43
3.2	Ergebnisse der In situ-Hybridisierung:.....	47
3.2.1	Darstellung des Sklerotoms durch <i>Pax1</i>	47
3.2.2	Bilder der <i>Pax1</i> -Ergebnisse transversal geschnitten	49
3.2.3	Darstellung des Myotoms durch <i>MyoD</i> und <i>Myf5</i>	53
3.2.4	Bilder der Wholemouts	62
3.2.5	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	64
3.3	Immunhistochemische Färbung mit MF 20.....	67
3.3.1	Ergebnisse der Immunhistochemie mit MF 20	67
3.3.2	Tabelle der MF20-Abbildungen.....	68
4	Diskussion	70
4.1	Vergleich zwischen den Ergebnissen der Semidünnschnitte und der mit Sonden markierten Schnitten	70
4.2	Dynamik der Somitenentwicklung anhand der Schnittserien.....	72
4.2.1	<i>Pax1</i> und seine Entwicklung	72
4.2.2	Vergleich der myotomalen Markern	73
4.2.3	Dynamik der Somitogenese	73
4.3	Entwicklungsunterschiede in den kranialen und kaudalen Bereichen des Embryos.	75
4.3.1	Morphologischer Vergleich.....	75
4.3.2	Myotomaler Vergleich	76

4.3.3	Sklerotomaler Vergleich	76
4.4	Die fehlende Epithelialisierung des ventrolateralen Quadranten der Somiten I und II in den Stadium HH 18 und 19	77
5	Zusammenfassung	80
5.1	Summary.....	81
6	Literaturverzeichnis.....	83
8	Danksagung.....	91
9	Erklärung.....	92

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Best.Nr.	Bestell-Nummer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d	Tag (englisch: day)
Dar.	Darstellung
DML	dorsomediale Lippe (des Dermomyotoms)
et al.	und andere (latein: et alii)
etc.	und so weiter (latein: et cetera)
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde (englisch: hour)
HH	Hamburger und Hamilton, Stadien der Embryonalentwicklung
konz.	konzentriert
max.	maximal
mRNA	messengerRNA (Ribonukleinsäure)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mind.	mindestens
min	Minute
prod.	produziert
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Somit
semi	Semidünnschnitt
s.o.	siehe oben
Somit I	Somit römisch eins, Zählweise von kaudal nach kranial
Somit 1	Somit arabisch eins, Zählweise von kranial nach kaudal
s. u.	siehe unten
Vergr.	Vergrößerung
VLL	ventrolaterale Lippe (des Dermomyotoms)
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
®	geschütztes Warenzeichen

Abbildungsverzeichnis

DAR. 1 BILD: COURTESY OF M. SCAAL, INSTITUT FÜR ANATOMIE UND ZELLBIOLOGIE, ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG; GRAFIK: PARAXIALES MESODERM SCHEMATISCH	14
DAR. 2 SCHNITT 1, GRAFIK (LINKS): EPITHELIALER SOMIT SCHEMATISCH, (VERÄNDERT NACH SADLER, MEDIZINISCHE EMBRYOLOGIE, GEORG THIEME VERLAG); BILD (RECHTS): ELEKTRONENMIKROSKOPISCH (COURTESY OF H. J. JACOB, BOCHUM)	15
DAR. 3 BILD OBEN LINKS: SCHNITT 2 S. DAR. 1: KOMPARTIMENTIERTER SOMIT, SEMIDÜNNNSCHNITT LICHTMIKROSKOP; BILD UNTEN LINKS: ELEKTRONENMIKROSKOP, VERGRÖßERUNG 40FACH (COURTESY OF K. W. TOSNEY); GRAFIK OBEN RECHTS: SCHEMATISCH DERMOMYOTOM UND SKLEROTOM DERMATOM, MYOTOM UND SKLEROTOM; GRAFIK UNTEN RECHTS (GRAFIKEN VERÄNDERT NACH SADLER, MEDIZINISCHE EMBRYOLOGIE, GEORG THIEME VERLAG)	16
DAR. 4: ÜBERSICHT EMBRYONALSTADIEN, INKUBATIONSZEIT, SOMITENANZAHL	24
DAR. 5: SEMIDÜNNNSCHNITTE SAGITTAL, HH 17 BIS HH 27, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 20FACH	42
DAR. 6: SEMIDÜNNNSCHNITTE TRANSVERSAL, HH 17 BIS HH 27, SOMIT I BIS III, LICHTMIKROSKOP, VERGRÖßERUNG 40FACH	45
DAR. 7: SEMIDÜNNNSCHNITTE TRANSVERSAL, HH 18 BIS HH 27, SOMIT IV, LICHTMIKROSKOP, VERGRÖßERUNG 40FACH.....	46
DAR. 8: SEMIDÜNNNSCHNITT TRANSVERSAL, HH 20 BIS HH 22, SOMIT IV, LICHTMIKROSKOP, VERGRÖßERUNG 40FACH.....	46
DAR. 9: VIBRATOM-SCHNITTE HH 17 BIS HH 25, SOMIT I BIS III, PAX1-DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	51
DAR. 10: VIBRATOM-SCHNITTE HH 17 BIS HH 22, SOMIT IV UND V, PAX1-DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	52
DAR. 11: VIBRATOM-SCHNITTE HH 17, 20, 23, SOMIT VI, PAX1-DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	53
DAR. 12: VIBRATOM-SCHNITTE HH 17, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	54
DAR. 13: VIBRATOM-SCHNITTE HH 18, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	55
DAR. 14: VIBRATOM-SCHNITTE HH 19, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	56

DAR. 15: VIBRATOM-SCHNITTE HH 20, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	57
DAR. 16: VIBRATOM-SCHNITTE HH 21, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	58
DAR. 17: VIBRATOM-SCHNITTE HH 22, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	59
DAR. 18: VIBRATOM-SCHNITTE HH 23, SOMIT I BIS V, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	60
DAR. 19: VIBRATOM-SCHNITTE HH 24, SOMIT I BIS IV, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	61
DAR. 20: VIBRATOM-SCHNITTE HH 25, SOMIT I BIS IV, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	61
DAR. 21: VIBRATOM-SCHNITTE HH 26, SOMIT I UND II, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 40FACH	62
DAR. 22: WHOLEMOUNTS HH 18 BIS HH 28, TAILBUD, <i>PAX 1</i> -, <i>MYOD</i> - UND <i>MYF5</i> - DARSTELLUNG, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 10FACH.....	63
DAR. 23: TABELLARISCHE ÜBERSICHT SOMITENSTADIEN, HH 17 BIS HH 27, SEMIDÜNNNSCHNITTE, <i>PAX1</i> -, <i>MYOD</i> -, <i>MYF5</i> -DARSTELLUNG.....	66
DAR. 24: WHOLEMOUNT-ABBILDUNGEN MF 20, HH 17 BIS HH 25, LICHTMIKROSKOP VERGRÖßERUNG 10FACH.....	69

1 Einleitung

Der Körperbau der Wirbeltiere ist wesentlich durch das knöcherne Skelett gekennzeichnet. Dies besteht aus dem Skelett der Gliedmaßen, dem Schädel und dem Skelett des Stammes. Das Skelett des Stammes umfasst die Wirbelsäule (*Columna vertebralis*), die Rippen (*Costae*) und das Brustbein (*Sternum*). Das grundlegende Bauprinzip der Entwicklung des Achsenskeletts ist die Segmentierung. Die Segmentierung ist gekennzeichnet durch den Aufbau einer Gesamtheit aus gleichwertigen Teilen, welche im Einzelnen voneinander abgrenzbar sind. Diese sogenannte Metamerie ist typisch für die embryonale Entwicklung der Chordaten. Sekundär erfahren die Metameren dann eine ortsspezifische Entwicklung und Differenzierung, welche sie letztendlich zu typischen funktionellen Körperteilen machen. Die Metamerie der Wirbeltiere bezieht sich neben dem knöchernen Skelett auch auf Muskulatur, Nerven und Gefäße. Die Segmentierung wird durch die Somiten (Urwirbel) begründet. Somiten bilden sich während der Primitiventwicklung aus dem unsegmentierten paraxialen Mesoderm. Sie liegen beidseits neben dem Neuralrohr. Zunächst sind sie epithelial, erfahren dann einen Prozess der Mesenchymalisierung, bevor sie sich weiter differenzieren in sekundäre Wirbelsäulenbestandteile, die bindegewebige Grundlage für die dorsale Körperwand und große Teile der Skelettmuskulatur.

Bisherige Untersuchungen der Somiten beschäftigen sich überwiegend mit den Somiten des Rumpfes. Kaudale Bereiche des paraxialen Mesoderms und Somiten des Schwanzes sind noch unzureichend untersucht. Die hier vorliegende Arbeit untersucht den morphologischen Zustand und zeitlichen Verlauf der Entwicklung der kaudalen Somiten (Schwanzsomiten) beim Hühnerembryo. Insbesondere wird der Reifungsprozess zwischen epithelialen und mesenchymalem Charakter der Somiten beschrieben.

Die Entwicklung des Hühnerembryos besteht aus zwei Phasen. An erster Stelle steht die Primitiventwicklung, welche drei Stadien enthält: die Furchung, die Keimblattbildung und die Ausbildung von Primitivorganen. Außerdem werden die Eihäute gebildet. Anschließend steht die zweite Phase der Organentwicklung. Hierbei werden die Organanlagen gebildet, die nun durch Wachstum und Differenzierung bis zum Schlupf weiterentwickelt werden.

Beide Phasen bilden zusammen die pränatale Periode. Diese beginnt mit der Befruchtung, die beim Vogel eine innere Besamung darstellt. Direkt anschließend erfolgt die Furchung, welche durch Teilung der Zygote charakterisiert ist. Beim Huhn findet eine partielle diskoidale Furchung statt.

1.1 Gastrulation

Zur Bildung des dreidimensionalen Embryos setzt sich die Entwicklung nach der Furchung mit der Keimblattbildung fort. Hierbei entsteht zuerst die einschichtige Keimscheibe oder Blastoderm. Die zentralen Zellen der Keimscheibe sind durch die Subgerminalhöhle vom darunterliegenden Dotter getrennt und bilden die Area pellucida. Am Rand der Keimscheibe liegt die Area opaca, die in Kontakt mit dem Dotter steht. Nun wandern einige Zellen von der Oberfläche in die Subgerminalhöhle und bilden vereinzelt Zellinseln (primärer Hypoblast), während die meisten Zellen an ihrer Position bleiben und den Epiblasten bilden. Anschließend wandern auch Zellen vom Randbereich (posterior) diesen nach und schließen sich ihnen an. Gemeinsam bilden sie den sekundären Hypoblast. Epiblast und Hypoblast sind am Rand verwachsen. Der Hohlraum zwischen den beiden Keimblättern ist das Blastozöl. Die Entwicklung wird nun durch die Eiablage unterbrochen und erst durch die Brutwärme fortgesetzt.

In der zweiten Phase der Keimblattbildung entsteht das Mesoderm. Zuerst entwickeln sich hierbei im Epiblast der Primitivstreifen, die Primitivrinne und die Kopfanlage. Der Primitivstreifen entsteht als dichte Zellansammlung im kaudalen Bereich des Epiblasten und streckt sich von hier aus Richtung kranial, bis er ca. 60 % bis 75 % der Länge der Area pellucida einnimmt. Er legt die embryonale kraniokaudale Achse fest. Die Primitivgrube entsteht zeitgleich durch das Absinken von Zellen in der Mitte des Primitivstreifens. Sie dient als Durchgang für die ins Blastozöl wandernden Zellen. Am kranialen Ende des Primitivstreifens sitzt der Hensen'sche Knoten. Sobald der Primitivstreifen gebildet ist, beginnt die Wanderung von Epiblastzellen ins Blastozöl. Durch den Hensen'schen Knoten wandern Zellen, welche sich zu Kopfmesoderm und Chorda dorsalis entwickeln. Weiter kaudal wandern Zellen auch in die Tiefe und schieben sich zwischen Epi- und Hypoblast, wo sie später endodermale und mesodermale Gewebe bilden. Ektodermale Zellen bewegen sich in Richtung Dotter und liegen diesem letztendlich als äußere Umhüllung auf. Das Endoderm ersetzt schließlich den Hypoblasten. Bei der Umwachsung des Dotters folgt das Mesoderm den beiden anderen Keimblättern und liegt zwischen den beiden.

Aus den drei Keimblättern bilden sich während der Embryonalperiode die Embryonalorgane: Aus dem Ektoderm entstehen Epidermis und das Nervensystem, aus dem Endoderm das Darmrohr. Chorda dorsalis, Somiten, intermediäres und laterales Mesoderm gehen aus dem Mesoderm hervor.

Somiten sind ballförmige epitheliale Gebilde, die sich beidseits des Neuralrohres befinden. Zunächst schnürt sich der epitheliale Somite vom unsegmentierten Strang des paraxialen Mesoderms ab und erfährt dann durch Mesenchymalisierung eine Umformung zum reifen Somite. Der kompartimentierte Somite besteht aus dem dorsal gelegenen Dermomyotom und dem ventral liegenden Sklerotom (s.u.).

Es wird zwischen primärer und sekundärer Gastrulation unterschieden, wobei der Abschnitt der Somiten 1 bis 28 des Primitivstreifens durch primäre Gastrulation gebildet wird. Der kaudal gelegene Bereich, der die folgenden Somiten bildet, entsteht durch sekundäre Gastrulation (Griffith et al., 1992). Weiterhin beschrieb Holmdahl (1925) die Entwicklung der Wirbeltiere in zwei aufeinander folgenden Prozessen. Sie beginnt mit der primären Körperentwicklung, welche die Kopf- und Rumpfstrukturen hervorbringt. Diese entstehen aus der Keimscheibe durch Gastrulation. Darauf folgt die sekundäre Körperentwicklung. Sie vollzieht sich im embryonalen Schwanzbereich. Die Strukturen des Schwanzes bilden sich direkt aus den dort ansässigen, undifferenzierten Mesenchymzellen ohne keimblatt-ähnliche Strukturen als Zwischenprodukte aufzuweisen. Diese Theorie ist vergleichbar mit der Gliedmaßenentwicklung und scheint beim Säugetier gesichert. Die Bildung des Neuralrohres weist hier Besonderheiten auf. Bei der sekundären Neurulation, welche bei Huhn und Säugetieren im Schwanz stattfindet, verdichtet sich das Schwanzgewebe, bildet einen soliden, markhaltigen Kern und formt letztlich das Neuralrohr. Diese Mesenchymzellen stammen aus den Resten des Hensen'schen Knotens und Primitivstreifens. Das primäre Neuralrohr entsteht im Kopf und Rumpf durch die Abfaltung der Neuralplatte und der Verbindung der Neuralfalten. Eine überlappende Phase zwischen primärer und sekundärer Neurulation besteht auf Höhe des kaudalen Neuroporus, wobei hier das primäre Neuralrohr ventral von beiden liegt. Beide vereinigen sich letztendlich. Diese überlappende Zone befindet sich im Bereich der Somiten 28 bis 34.

Anhaltspunkte, die für die Theorie von Holmdahl sprechen, ergeben sich z.B. aus verschiedenen Untersuchungen von Schoenwolf (1978, 1979, 1979) welche darauf hinweisen, dass nervale, muskuläre, vaskuläre und skelettartige Komponenten aus undifferenziertem Mesenchym entstehen.

Desweiteren sieht man am Genmuster¹ des kaudalen Abschnittes eine deutliche Abgrenzung zu Kopf und Rumpf (Handrigan 2003).

Eine andere Auffassung der kaudalen Entwicklung besteht in der Annahme der „Einheitlichkeit und Kontinuität“ des vertebraalen Körperbauplans (Vogt, 1926). Hierbei wird

¹ *cCDX-B, Ch-T, Ch-Tbx6L, Gnot1*

angenommen, dass die weiterführende Gastrulation entlang der kraniokaudalen Achse auch die Entwicklung im Schwanzbereich bestimmt. Die Schwanzknospe enthält ein Muster an verschiedenen Zellpopulationen. Diese haben ihre Ursprünge im kranialen Embryo (Pasteels, 1939) und hängen somit auch von der kranialen Entwicklung ab. Speziell für den Hühnerembryo wurde eine durch Gastrulation entstandene heterogene Anhäufung von überwiegend mesenchymalen Zellen im Schwanzbereich entdeckt (Catala et al., 1995). Im kranialen Embryo entstehen die Neuralfalten und das Neuralrohr aus der Neuralplatte. Diese Strukturen entsprechen im kaudalen Embryo dem soliden medullären Kern, der aus epithelialen Zellen der Neuralplatte entsteht (Catala et al., 1996; Le Douarin et al., 1998). Durch die Spezifizierung mit molekularen Markern² wurde auch der Primitivstreifen in verschiedenen Schwanzregionen nachgewiesen. Außerdem wurden gastrulationsähnliche Zellbewegungen im jungen Schwanz beobachtet (Knezevic et al., 1998). Neurale Vorläuferzellen des sich rückbildenden Hensen'schen Knotens werden in die Bildung von primären und sekundären neuralen Strukturen miteinbezogen und durch FGF's³ aufrecht erhalten (Mathis et al., 2001). Hierauf stützt sich die heutige Annahme, dass die kaudale Entwicklung des Hühnerembryos auf dem Mechanismus des rostralen Embryos aufbaut.

1.2 Differenzierung des Mesoderms

Durch Differenzierungsvorgänge des Mesoderms entwickeln sich die Leibeswand, die Körperhöhlen und die Körperform des Embryos. Aus dem Mesoderm entstehen Binde- und Stützgewebe, Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur (excl. Irismuskel), Blut, Lymph- und Blutgefäße, Milz, Nebennierenrinde, Serosa, Nieren, Keimdrüsen (excl. Keimzellen) und Geschlechtsgänge.

Das Mesoderm gliedert sich in vier verschiedene Abschnitte, die auch unterschiedliche Funktionen aufweisen:

1) Axiales Mesoderm: Das axiale Mesoderm stellt die Chorda dorsalis dar. Sie bildet sich im kranialen Bereich des Embryos und dient als primitives Stützskelett.

2) Paraxiales Mesoderm: s.u.

² T, Gnot 1

³ Fibroblast growth factor

3) intermediäres Mesoderm: Das Intermediäre Mesoderm bildet in der Hals- und vorderen Brustregion segmental angeordnete Zellhaufen. Im kaudalen Bereich hingegen stellt es sich unsegmentiert dar. Es verbindet das paraxiale mit dem lateralen Mesoderm und bildet den Vorläufer des Urogenitaltraktes (Nephrotom und nephrogener Strang). Durch die Trennung des intermediären Mesoderms von den Seitenplatten wird aus dem Übergang ihrer Blätter die Mesenterialplatte, aus welcher sich das Dorsalgekröse des Darms entwickelt.

4) Laterales Mesoderm: Das laterale Mesoderm besteht aus einem parietalen und viszeralem Blatt. Durch flächenparallele Spaltung in diese beiden Teile entsteht das Zölom. Das parietale Blatt liegt dem Ektoderm als Somatopleura an. Das viszerale Blatt verbindet sich mit dem Entoderm (Splanchnopleura).

1.2.1 Paraxiales Mesoderm

Das paraxiale Mesoderm liegt lateral der Neuralplatte bzw. des Neuralrohrs. Sein unsegmentierter Anteil (presomitisches Mesoderm) wird als Segmentplatte bezeichnet. Die Segmentplatte besteht aus lose angeordneten Mesenchymzellen. Die Zelldichte variiert zwischen kaudal locker liegenden Zellen mit großen Interzellularspalten und kranial sehr dicht liegenden Zellen. Dementsprechend befindet sich in der kranialen Segmentplatte mehr extrazelluläre Matrix als in ihrem kaudalen Anteil (Jacob et al., 1991). Der kraniale Anteil des paraxialen Mesoderms gliedert sich in ballförmige Zellaggregate, die Somiten. Jeder Somite kann in ein mediales und laterales Kompartiment eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich in ihrer zellulären Herkunft. Der mediale Teil findet seinen Ursprung in Stammzellen. Diese Stammzellen bilden sich während des Rückgangs des Primitivstreifens an dessen kranialsten Ende wie auch im Hensen'schen Knoten (Iimura et al., 2007). Das laterale Kompartiment entsteht durch ständige Einwanderung von epiblastischem Material. Dieses Phänomen wird auch bei niederen Vertebraten beobachtet und als fortführende Gastrulation betrachtet.

Die Segmentierung beginnt mit der Bildung der okzipitalen Somiten, welche zwischen Ohrbläschen und der Mitte der Keimscheibe lokalisiert sind. Das rostral der okzipitalen Somiten gelegene Mesoderm bleibt unsegmentiert (prootischer Abschnitt). Anschließend folgt der Prozess der Segmentierung des postotischen Mesoderms in kraniokaudaler Richtung.

Der Begriff „Somit“ wurde von Balfour (1881) eingeführt. Zuvor wurden diese segmentalen Einheiten von Remak (1850) beschrieben und als „Provertebrae“ bezeichnet. Die erste detaillierte Beschreibung von Vogelsomiten wurde von Williams (1910) gegeben. Die

Urwirbel liefern neben dem Mesoderm für die sekundäre Wirbelsäule die bindegewebige Grundlage für die Körperwand und große Teile der Skelettmuskulatur.

Die Somitenbildung lässt sich in zwei Prozesse unterteilen: Segmentierung und Epithelialisierung.

1.3 Segmentierung

Das Potential zur Selbstsegmentierung und die Fähigkeit, auch andere Strukturen des Körpers zu segmentieren, ist eine einzigartige Eigenschaft des paraxialen Mesoderms. Nach der Somitenbildung organisieren sich auch angrenzende Gewebe wie das Neuralrohr segmental. Dieses geschieht über Interaktionen mit Vorläuferzellen der sensorischen und motorischen Nerven (Rickmann et al., 1985; Stern et al., 1986). Auch am lateralen Somitenrand findet ein Prozess der Organisation statt. Hier werden endotheliale Zellen für die anliegenden Ursprungsgefäße bereitgestellt (Christ et al., 1979; Jacob et al., 1979).

Es wurde entdeckt, dass die Segmentation von einem rhythmischen molekularen Mechanismus gesteuert wird. Dieser wird „Segmentation Clock“ genannt (Palmeirim et al., 1997). Die Segmentation Clock treibt die Somitenabschnürung in regelmäßigen Intervallen an. Sie kontrolliert zyklische Genexpressionen, welche wellenartig vom kranialen zum kaudalen Ende des paraxialen Mesoderms wandern. Die dortigen Zellen stellen die Genexpression je nach Entwicklungsstufe an und aus. Wenn die Genexpression eine spezifische Position (maturation wavefront) im paraxialen Mesoderm erreicht, beginnen die kranial gelegenen Zellen dieser Position zu reifen und exprimieren kurz danach spezifische Gene (s.u.) (Dubrulle et al., 2001; Sawada et al., 2001). Diese *wavefront* wandert mit Ausdehnung des Embryos entlang der anterior-posterior-Achse insgesamt nach kaudal, bleibt aber immer an der Position des gerade gereiften Somiten und verbleibt auch dort, bis dieser seine endgültige Größe erreicht hat. Alle 90 Minuten wird das Gen *c-hairy-1* in den Zellen der Segmentplatte exprimiert. Diese Expression schreitet als Welle vom kaudalen bis zum kranialen Ende voran, wo sie die Reifung eines Somitenpaares induziert. *C-hairy-1* wird zehn bis zwölf Mal in der Segmentplattenzelle exprimiert bevor diese Zelle als Teil eines Somiten heranreift (Pourquie 1999). Der *Notch*-Signalweg stellt einen weiteren wichtigen Regulator in der Somitenbildung dar. *Notch*-Gene gelten als Oszillatoren, welche die zyklischen Genexpressionen gleichschalten. Wenn dieser Oszillator ausfällt, entwickeln sich die Somiten unvollständig, es kommt zur Apoptose und Wirbel und Rippen weisen Missbildungen auf

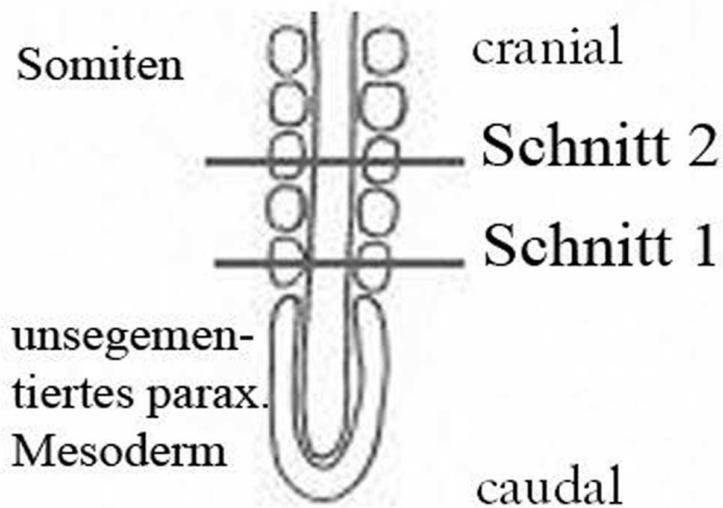
(Conlon et al., 1995). *Notch*-Gene gelten nicht als essentieller Regulator der Segmentation Clock, steuern aber lokal im paraxialen Mesoderm die cyclischen Genexpressionen zusätzlich denen der molekularen Uhr bei. Die Segmentation Clock selbst wird von weiteren Genen gesteuert. Als negativer Regulator gilt das *Wnt*-Signal *Axin2*. Dieses wird außerhalb der *Notch*-gekennzeichneten Phase im paraxialen Mesoderm exprimiert (Aulehla et al., 2003). *Wnt3a* ist allen Komponenten vorgeschaltet, so auch *Axin2*, und gilt als Initiator der molekularen Uhr.

Auch *Hox*-Gene gestalten die Entwicklung entlang der embryonalen Längsachse (Burke et al., 1995; Burke 2000). Die segmentale Identität der einzelnen Abschnitte wie lumbal, kokzygeal etc. wird durch *Hox*-Gene festgelegt. Sie bestimmen also die positionelle Identität der Somiten, wobei die Musterbildung schon im präsomitischen Mesoderm festgelegt wird. Hierbei erhalten mesodermale Zellen Positionswerte, die ihre Entwicklung bestimmen. So gestalten sich zum Beispiel die Halswirbel in anderer Form als die Lendenwirbel. *Hox*-Gene werden entsprechend der fortschreitenden Gastrulation exprimiert und treten in Clustern in einer bestimmten zeitlichen und räumlichen Anordnung auf. Beim Huhn werden 23 *Hox*-Gene im paraxialen Mesoderm exprimiert, wobei im postanalen Schwanz *Hox d12* und *Hox d13* vorkommen.

Während der Somitenentwicklung werden segmental organisierte Strukturen gebildet:

- 1) Die Wirbelsäule: Neben der segmentierten Wirbelsäule sind außerdem Muskeln und Bänder in segmentierter Form vorhanden.
- 2) Die thorakale Wand besteht ebenfalls aus segmentierten Strukturen: Rippen, Bänder und Muskeln.
- 3) Andere Skelettmuskeln
- 4) Segmental angeordnete Spinalnerven

Folglich ist die segmentale Körperorganisation der Vertebraten durch die Segmentierungsvorgänge des paraxialen Mesoderms entstanden.



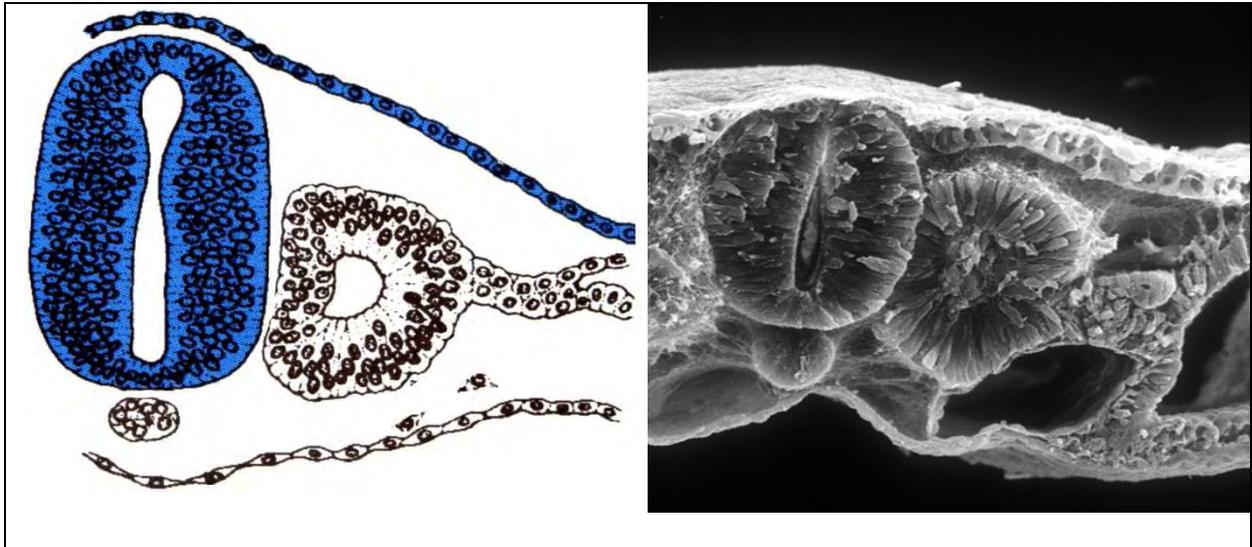
Dar. 1 Bild: Institut für Anatomie und Zellbiologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
 Grafik: Paraxiales Mesoderm schematisch, Schnitt 1 und 2 s. u. Dar. 2 und 3

1.4 Somitogenese

Vor der Somitogenese kann eine metamere Anordnung der mesenchymalen Zellen des unsegmentierten paraxialen Mesoderms beobachtet werden, die als Somitomerie bezeichnet wird. Beim Huhn sind 10 bis 12 solcher Somitomere beschrieben worden, die im Elektronenmikroskop betrachtet werden können (Packard 1978; Packard and Meier 1983; Bellairs 1986). Somitomere sind ca. 175 Mikrometer große Blöcke aus mesodermalen Zellen und stellen das Segmentierungsmuster der Segmentplatte dar. Hierbei verdichten sich anfänglich die mesenchymalen Mesodermzellen. Anschließend schnüren sie sich paarig von der Segmentplatte ab und formen jeweils die beiden jüngsten Somiten. Die Somitogenese ist ein autonomer Prozess, der keiner externer Signale bedarf. Das molekulare Muster, welches die Position der Somiten auf der Längsachse anordnet, ist vorher in den Zellen der Segmentplatte festgelegt worden (s.u.).

Während der Abschnürung entsteht aus den ursprünglich mesenchymalen Zellen ein epithelialer Zellverband. Der annähernd ballförmige Somit besteht nun aus einem einschichtigen, mehrreihigen Epithel, das eine Anhäufung von Mesenchymzellen umgibt und somit eine zentrale Höhle bildet, das Somitozöl. Jeder Somit ist umgeben von einer extrazellulären Matrix, die ihn mit den angrenzenden Strukturen verbindet (Basalmembran). Der epitheliale Somit besteht aus multipotenten Zellen, welche sich in ihrer weiteren

Entwicklung nach den Einflüssen umliegender Strukturen richten (Christ and Ordahl 1995; Brent and Tabin 2002).

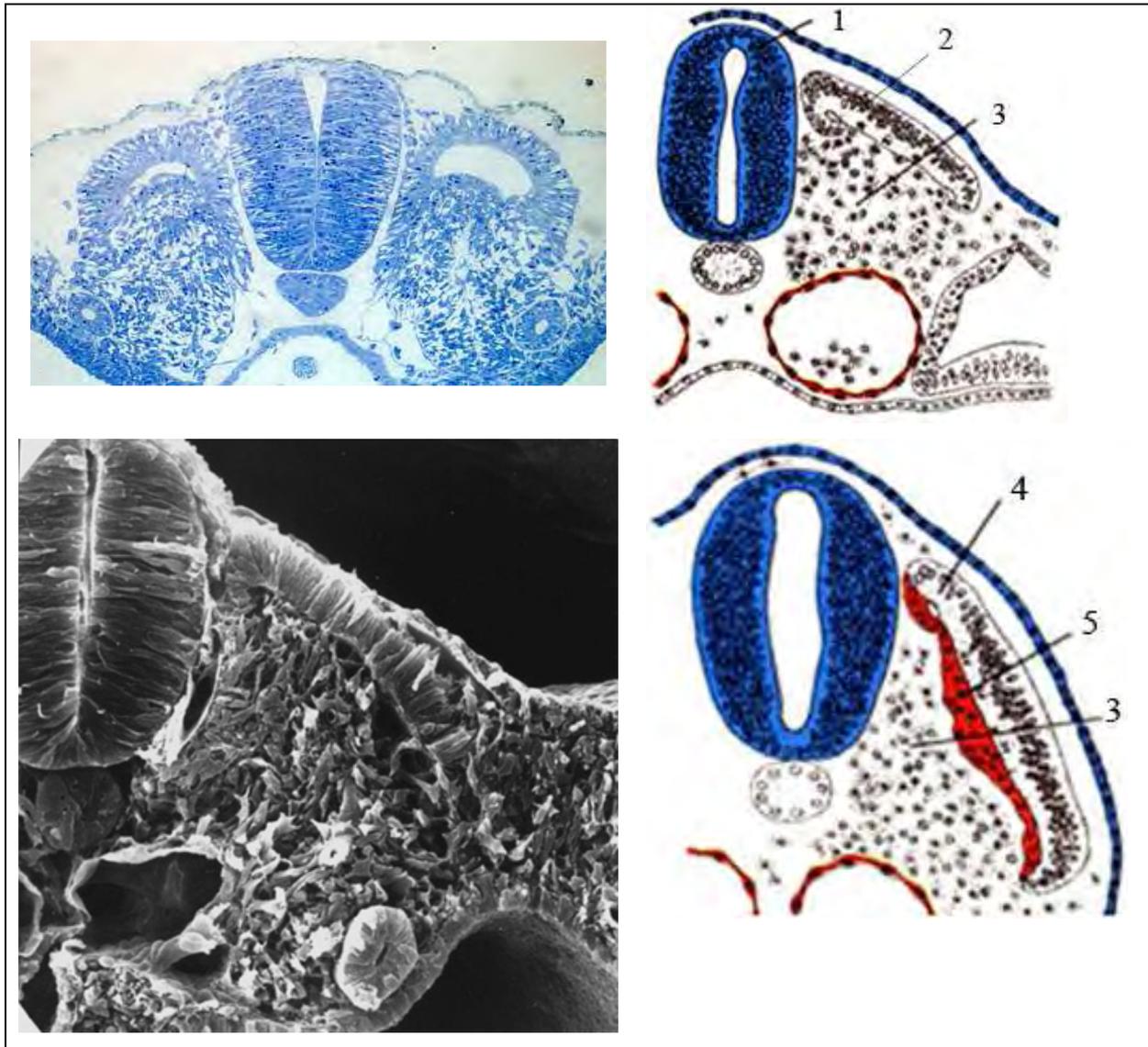


**Dar. 2 Schnitt 1(s. Dar.1), Grafik (links): epithelialer Somit schematisch, (verändert nach Sadler, Medizinische Embryologie, Georg Thieme Verlag);
Bild (rechts): Elektronenmikroskop (Courtesy of H. J. Jacob, Bochum)
blau: Neuralrohr, darunter Chorda dorsalis, weiß: epithelialer Somit**

Nach dem epithelialen Zustand kompartimentiert sich der Somit in einzelne Abschnitte. Dieser Vorgang wird epithelio-mesenchymaler Übergang genannt. Dabei erweitern sich die Extrazellularräume durch Hyaluronat, die Zellen wandern auseinander und die Zellkontakte an den Spitzen werden reduziert (Solursh et al., 1979). Die Zellen bilden Filopodien und lösen das Epithel auf (Trelstad 1977). Der epithelio-mesenchymale Übergang ist nicht von Signalen der Chorda dorsalis oder des Neuralrohres gesteuert, wie Untersuchungen durch Transplantationen dieser Organe zeigten (Christ et al., 1972; Hirano et al., 1995).

1.5 Kompartimente der Somiten

Aus den epithelialen Somiten entstehen nacheinander durch Umformungsprozesse (s.o.) mesenchymale Strukturen. Der anfänglich runde Somit formt sich dabei um und besteht letztendlich aus dem Sklerotom, dem Dermomyotom und dem Myotom. Die Umformung beginnt im ventralen Bereich.



Dar. 3 Bild oben links: Schnitt 2 s. Dar.1: kompartimentierter Somit, Semidünnschnitt Lichtmikroskop
 Bild unten links: Elektronenmikroskop, Vergrößerung 40fach (Courtesy of H. J. Jacob)
 Grafik oben rechts: schematisch Dermomyotom und Sklerotom Dermatome, Myotome und Sklerotome
 Grafik unten rechts: 1 Neuralrohr, 2 Dermomyotom, 3 Sklerotom, 4 Dermatome, 5 Myotome
 (Grafiken verändert nach Sadler, Medizinische Embryologie, Georg Thieme Verlag)

1.5.1 Dorsoventrale Kompartimentierung

1.5.1.1 Ventrale Somitenhälfte

Aus dem ventralen Anteil des zunächst epithelialen Somiten entsteht zusammen mit den Somitozytellen das Sklerotom. Dieses wird so bezeichnet, da es die Proliferationszone für das Mesenchym des Achsenskeletts darstellt. Die Epithelzellen nehmen dabei spindelförmige Gestalt an und lösen sich aus ihrem Zellverband. Nach Auflockerung füllen sie den ventral entstehenden Hohlraum aus und bilden in ihrer Gesamtheit schließlich das axiale Mesenchym. Einige Zellen wandern in Richtung Chorda dorsalis und Neuralrohr und umgeben diese. Das Sklerotom umschließt außerdem die primitiven Aorten, den Wolff'schen Gang und die

Kardinalvenen. Das Sklerotom wird in drei Subkompartimente unterteilt (Christ et al., 2000; Christ et al., 2004):

1) Zentrales Sklerotom: Der zentrale Teil des Sklerotoms liegt eng am Dermomyotom und später auch am Myotom. Es besteht sowohl aus dichten wie auch losen Zellanhäufungen (Verbout 1985; Christ et al., 1992). Aus dem zentralen Sklerotom gehen die Laminae und Pedikulae der Neuralbögen und die proximalen Rippenteile hervor.

2) Ventrales Sklerotom: Der ventrale Teil stellt sich zunächst zellfrei dar (Jacob et al., 1975; Christ et al., 1992; Christ et al., 2000). Er ist ausgefüllt mit einer extrazellulären Matrix (ECM). Die ECM verbindet die Sklerotomzellen mit der Basalmembran der Chorda dorsalis und dient als Substrat für die einwandernden Sklerotomzellen (Jacob et al., 1975). Die Immigration ist abhängig von Signalen der Chorda dorsalis. Dazu gehören *Shh*, *Noggin* und *Fgf8*, welche nun die Expression von *Pax1* und anderen⁴ Genen induzieren (Brand-Saberi et al., 1993; Johnson et al., 1994). Anschließend proliferieren die Zellen und bilden schließlich die Wirbelkörper und Bandscheiben.

Unter dem Einfluss von Signalen der Chorda dorsalis⁵ exprimieren die Zellen des zentralen sowie ventralen Sklerotoms *Pax1*. Durch die *Sonic hedgehog*- Gene wird der Beginn der Sklerotombildung wie auch die Aufrechterhaltung gesteuert. Im dorsalen Sklerotom wird die *Pax1*-Expression von *Bmp4*-Signalen (abstammend von der Deckplatte) unterdrückt (Fan and Tessier-Lavigne 1994; Johnson et al., 1994; Fan et al., 1995).

3) Dorsales Sklerotom: Auch am Ort des dorsalen Sklerotoms besteht zunächst ein zellfreier Raum. Nach der Immigration von sklerotomalen Zellen kommt es - verglichen mit den anderen Anteilen des Sklerotoms - zu einer späten Entwicklung. Diese Zellen exprimieren unter dem Einfluss von *Bmp4* kein *Pax1* (Ebensperger et al., 1995). Statt dessen exprimieren sie *Msx1* und *Msx2* (Monsoro-Burq et al., 1996). Die *Msx*-Gene stehen also typischerweise für den dorsalen Sklerotombereich von Beginn seiner Positionierung an bis zur späteren Knorpeldifferenzierung. Als weiteres Gen, welches die Entwicklung des dorsalen Sklerotoms steuert, gilt *Mfh1* (Kaestner et al., 1996; Winnier et al., 1997). *Mfh1* wird durch *Shh* reguliert. Aus dem dorsalen Sklerotom differenzieren sich die dorsalen Anteile der Neuralbögen und die Dornfortsätze der Wirbel.

⁴ *Pax 9, Twist, Mfh1*

⁵ *Sonic hedgehog: Shh und Noggin*

Dem Sklerotom liegen eine Reihe wichtiger Strukturen an. Diese erlangen sowohl in ihrer Formgebung als auch in ihrer Produktion von beeinflussenden Signalen Bedeutung für das Sklerotom. Ventral befindet sich die Aorta, welche sich in ihrer Entwicklung nach medial zwischen Endoderm und Sklerotom bewegt. Medial liegen das Neuralrohr mit der Deckenplatte (roof-plate) und die Chorda dorsalis. Das Dermomyotom und später auch das Myotom befinden sich dorsal. Zwischen dem lateralen Sklerotom und der Zölonhöhle sind der Wolff'sche Gang und die Kardinalvene eingebettet.

Das unsegmentierte paraxiale Mesoderm exprimiert charakteristischer Weise *Pax3* und *Pax7* Gene (Bober et al., 1994; Goulding et al., 1994; Williams and Ordahl 1994). Bei Somitenabschnürung werden diese Gene im Somitozöl und der ventralen Somitenhälfte herunterreguliert. Dafür werden *Pax1* und *Pax9* aktiviert (Brand-Saberi and Christ 1993). Dieser Wechsel wird durch Signale⁶ der Chorda dorsalis und des Neuralrohrs vollzogen.

1.5.1.2 Dorsale Somitenhälfte

Der dorsale Abschnitt des Somiten behält nach der Kompartimentierung seinen epithelialen Charakter bei und bildet das Dermomyotom. Dieses liegt zwischen dem Sklerotom und dem Ektoderm und stellt eine Quelle mesodermalen Gewebes (Muskeln, Bindegewebe, Endothel, Knorpelgewebe) dar. Das Dermomyotom gilt als wichtige Drehscheibe des mesodermalen Zellschicksals.

Aus dem Dermomyotom bilden sich zwei Strukturen:

- 1) Dermatome: Das zentrale Dermomyotom stellt sich später als loses Mesenchym dar und bildet dermale und subkutane Vorläuferzellen. Es formt letztlich das Dermatom (Haut-, Kutisplatte). Das Dermatom liegt dachförmig beidseits des Neuralrohrs.
- 2) Myotome: Das Myotom befindet sich ventral des Dermatoms und liegt diesem direkt als tiefere Schicht an. Die Myotomzellen sind länglich und ziehen in kraniokaudale Richtung.

Das Dermomyotom enthält viele verschiedene Vorläuferzelllinien. Es liefert Material für die Skelettmuskulatur des Rückens, der Körperwand (Christ and Ordahl 1995), der Zunge (Couly et al., 1993; Huang et al., 1999) und der Extremitäten (Christ et al., 1974; Christ et al., 1977; Christ et al., 1977; Zhi et al., 1996). Außerdem bildet es die Dermis des Rückens (Mauger 1972; Christ et al., 1983) und Angioblasten (Wilting et al., 1995).

⁶ *Shh, Wnt, Bmp4*

Die Ränder des Dermomyotoms sind in ventraler Richtung leicht abgeknickt und werden als dorsomediale Lippe (DML) und ventrolaterale Lippe (VLL) bezeichnet. Diese bleiben zunächst epithelial und differenzieren sich später über Vorläuferzellen zur Rumpfmuskulatur. Der Vorgang verläuft in zwei Schritten, wobei in einem ersten nur myotomale Zellen der DML gebildet werden. Im darauffolgenden Schritt wandern Zellen der kaudalen und kranialen Dermomyotomgrenze und der VLL aus (Gros et al., 2004).

Durch Signale benachbarter Strukturen entsteht das Dermomyotom aus dem epithelialen Somiten. Dieser Prozess beginnt ab dem Somiten IV bzw. V, dauert einige Zeit an und ist mit Somit VII abgeschlossen. Folgende Signale und exprimierende Gewebe zählen unter anderem zur Initiation und Wachstum des Dermomyotoms:

- 1) Das dorsale Neuralrohr und das dorsale Ektoderm produzieren *Wnt*'s.
- 2) Das dorsale Neuralrohr produziert *Wnt1* und *3a*.
- 3) Das Ektoderm bildet *Wnt4, 6* und *7a*.

Neben den *Wnt*-Signalen spielen auch *Shh*-Signale im Prozess der Muskelbildung eine große Rolle. Diese werden vom Neuralrohr-Bodenplatten-Komplex gebildet. Eine ausgewogene Balance zwischen beiden Signalgruppen ist Voraussetzung für die korrekte Myogenese.

Das Dermomyotom exprimiert Gene der *Paired Box*-Genfamilie, wie *Pax3* und *Pax7*.

Die Entwicklung des Myotoms wird in zwei zeitliche Abschnitte gegliedert. Die frühe morphologische Manifestation zeigt sich in der Bildung von primitiven Muskelfasern. Es handelt sich um mononukleäre, postmitotische Myotomzellen. Alle Myotomzellen sind dermomyotomalen Ursprungs. Die myotomalen Vorläuferzellen werden zunächst deepithelialisiert. Darauf folgt eine Translokation dieser Zellen in die myotomale Domäne. Nun schließt sich die zweite Phase der Myotomentwicklung an. Die Einwanderung von myotomalen Zellen stoppt. Im Anschluss daran beginnt eine Phase des Wachstums, bei welcher die ursprünglich mononukleären Muskelfasern zu multinukleären Muskelzellen heranreifen. Vermutlich fusionieren diese mit Satellitenzellen.

Die Zellen des Myotoms sind durch die Expression von Genen wie *MyoD* oder *Myf5* gekennzeichnet. *MyoD* stellt einen muskel-regulierenden Faktor dar (muscle regulatory factor=MRF). Auch *Myf5* gehört der Familie der MRF's an. Es gibt Grund zur Annahme, dass *Shh* die dermomyotomale Expression von *Myf5* aktiviert. In seiner Abwesenheit hingegen stoppen die Somitenzellen ihre Proliferation und sterben ab. Somit könnte *Myf5* ein Faktor für die Aufrechterhaltung der Myogenese sein (Duprez et al., 1998; Teillet et al., 1998; Marcelle et al., 1999).

Das Myotom kann weiterhin mittels Muskelprotein-Nachweis „Myosin-Heavy-Chain“ dargestellt werden.

1.5.2 Kraniokaudale Kompartimentierung

Die Somitenabschnürung von der Segmentplatte erfolgt in kraniokaudale Richtung (Christ and Ordahl 1995; Gossler and Hrabe de Angelis 1998). Die Somiten liegen nach abgeschlossener Somitogenese beidseits des Neuralrohres in einem Strang, der sich von kranial nach kaudal bis in die Schwanzspitze erstreckt. Sie werden in Okzipital-, Zervikal-, Thorakal-, Lumbal-, Sakral- und Kokzygealsomiten unterteilt.

Die kraniokaudale Kompartimentierung prägt aus Somiten entstehende Strukturen wie die Rippen und Wirbelkörper wie auch das periphere Nervensystem. Dieses segmentale Muster wurde erstmals von Remak (1850) beschrieben. Die Wirbel entstehen aus dem Sklerotom, und zwar je aus der kaudalen Sklerotomhälfte eines Somiten und der kranialen Hälfte des angrenzenden kaudal gelegenen Sklerotoms (Brand-Saberi and Christ 2000; Huang et al., 2000). Diese Sklerotomhälften werden durch die von Ebner'sche Fissur getrennt.

1.6 Die Schwanzknospe

Die Schwanzspitze besteht aus einer Masse undifferenzierter, homologer Mesenchymzellen, welche die Reste von Hensen'schem Knoten und Primitivstreifen darstellen. In Stadium HH 11 beginnt die Bildung der Schwanzknospe mit der Verdichtung dieser Zellreste (Schoenwolf 1979; Schoenwolf and Delongo 1980; Schoenwolf and Smith 1990). Später reifen diese Zellen zu verschiedenen Geweben heran, wie zum Beispiel das sekundäre Neuralrohr und die Somiten. Zum Zeitpunkt des Stadiums HH 14 ist die Schwanzknospe eine mesenchymale Zellanhäufung. Darin liegt der Kern der dicht liegenden Mesenchymzellen (s.o.), welcher von paraxialem Mesoderm seitlich flankiert wird. Dieser wächst zum sekundären Neuralrohr aus, indem äußere Mesenchymzellen epithelial werden und ein Neuroepithel bilden. Mittig liegende Mesenchymzellen verändern sich dabei nicht. Zwischen beiden Zellschichten entsteht ein Hohlraum, welche sich später mit dem Lumen des primären Neuralrohres verbindet (Criley 1969; Klika and Jelinek 1969; Hughes and Freeman 1974; Schoenwolf 1979; Schoenwolf and Kelley 1980; Schoenwolf and Smith 1990). Das Neuralrohr und die Chorda dorsalis strecken sich bis fast ans Ende der Schwanzspitze.

Ein morphologisch sichtbarer Schwanz taucht in Stadium HH 20 auf. Ab diesem Zeitpunkt werden Somiten gebildet, welche sich später zu kokzygealen Wirbeln differenzieren. Ab

Stadium HH 20 besteht immer noch ein Rest an unsegmentiertem Mesoderm zwischen den letzten Somiten und dem kaudalen Ende des Schwanzes. Die Länge der Segmentplatte variiert zwischen 350 bis 500 μm . Je nach Entwicklungsstadium schnüren sich neue Somiten ab, während sich das unsegmentierte Mesoderm immer weiter nach kaudal „schiebt“. Die Knospe des Schwanzes bleibt dabei aber immer unsegmentiert (Amprimo et al. 1969; Bellair et al. 1986). Es ist nicht geklärt, ob dieser terminale paraxiale Mesodermabschnitt als Teil der Segmentplatte betrachtet werden kann. Zum einen wird das Schwanzknospen-Mesoderm als Teil der Segmentplatte angesehen, da es typischerweise Muskel- und Knorpelzellen enthält, die in der weiter kranial gelegenen Segmentplatte vorkommen. Dagegen unterscheidet es sich aber stark in der Menge dieser Zellen und wird somit als eigene Struktur bezeichnet (Krenn et al., 1990).

Der embryonale Schwanz erreicht seine maximale Länge im Stadium HH 25, nachdem er eine extensive Umgestaltung erfahren hat (Tibbles and Wiley 1988). Die Umgestaltung besteht aus drei Ereignissen (Schoenwolf 1981):

- 1) Differentielles Wachstum zwischen der Schwanzspitze und den kranial anliegenden Regionen
- 2) Miteinbeziehung der angrenzenden kranialen Region in den kaudalen Teil des Rumpfes
- 3) Zelltod an der Schwanzspitze

Am Ende des Prozesses steht der Rückgang der distalen Region des Schwanzes, wobei das undifferenzierte Mesenchym verbleibt. Der kraniale Anteil bildet den verbleibenden definitiven embryonalen Schwanz. Im Stadium HH 25 sind hohe Pyknoseraten messbar (Mills and Bellairs 1989). Es wird angenommen, dass durch die hohe Zelltodrate die Fortführung der Somitogenese gehemmt wird und somit ein Rest an unsegmentiertem paraxialen Mesoderm verbleibt (Bellairs 1986; Bellairs and Sanders 1986; Sanders et al., 1986).

Bei Untersuchungen des Schwanzes wurde 1925 von Holmdahl postuliert, dass alle Rudimente der kaudalen Region von der Schwanzknospe abstammen. Später wurde diese Aussage von Schoenwolf (1978) korrigiert. Die Schwanzknospe gibt Zellen an das Neuralrohr, die Somiten, das Mesenchym und die Kaudalarterien. Dagegen stammen die Chorda dorsalis und der Urdarm nicht von Schwanzknospenzellen ab.

Die zwischen Neuralrohr und dorsalen Somiten liegenden Neuralleistenzellen weisen Unterschiede in ihren Ursprungsgeweben auf (Schoenwolf et al., 1985). Es wird unterschieden zwischen primären und sekundären Neuralleistenzellen. Primäre Neuralleistenzellen stammen vom Ektoderm ab, während sekundäre direkt aus der

Schwanzknospe entstehen. Letztere scheinen nun sowohl an der Entstehung des Oberflächenepithels mitzuwirken als auch Spinalganglien zu bilden.

Insgesamt bilden sich beim Huhn zwischen 49 und 52 Somiten (Hamburger und Hamilton, 1951).

1.7 Somitenstadien

Die Entwicklung des Hühnerembryos wurde von Hamburger und Hamilton (1951) in verschiedene Stadien eingeteilt. Ihr Schema berücksichtigt die Morphologie und die Anzahl an geformten Somitenpaaren (HH-Stadien). Zu Beginn der Bebrütung stehen die präsomitischen Stadien HH 1 bis HH 6. Hier werden die Bildung des Primitivstreifens und des Hensen'schen Knotens sowie die Einfaltung des präaxialen Ekto- und Entoderms zur Einteilung herangezogen. Die Stadien, bei denen die Somitenzahl zur Klassifizierung herangezogen wird, umfassen HH 7 mit einem Somitenpaar bis HH 14 mit 22 Somitenpaaren. Anschließend folgen Stadium HH 15 bis HH 46, die durch externe Strukturen wie Gesichts- oder Extremitätenentwicklung bestimmt werden. Genauer beschrieben werden hier die Stadien HH 17 bis HH 27, die zur Datenerhebung herangezogen wurden.

Stadium HH 17 umfasst eine variierende Anzahl von 29 bis 32 Somitenpaaren. Die Bebrütungsdauer beträgt 52 bis 64 Stunden. Extremitätenwülste der Vorder- und Hintergliedmaßen erscheinen. Außerdem entsteht die Epiphyse. In Stadium HH 18 variiert die Anzahl an Somitenpaaren von 30 bis 36. Zeitlich kommen hier ca. 14 Stunden an weiterer Bebrütungsdauer hinzu. Weiterhin ist dieses Stadium definiert durch die noch unvollständige Schließung des Amnions. In den Stadien HH 17 und 18 werden lumbosakrale Somiten gebildet, die sich später zu Teilen der Hintergliedmaße (Somiten 26-33) wie auch zum Synsakrum differenzieren. Im nächsten Stadium (HH 19) schließt sich das Amnion komplett. Die Somitenzahl beträgt nun 37 bis 40. Hierbei entstehen die kaudalen Somiten des Lumbosakralbereichs, die später Bestandteil des Synsakrums werden. Außerdem kann bei maximaler Somitenzahl (40) schon der erste Schwanzsomit gebildet werden, welcher sich später zusammen mit dem kaudalsten sakralen Somiten zum ersten Schwanzwirbel differenziert. Weiteres Erkennungsmerkmal des Stadiums HH 19, das sechs Stunden nach Stadium HH 18 auftritt, sind die noch unpigmentierten Augen. Zwischen 40 und 43 Somiten existieren in Stadium HH 20. Außerdem entwickelt sich die Allantoisblase. Die Extremitäten wachsen und erreichen in der Länge die Hälfte ihrer Breite. Das Stadium HH 20 hat eine

Inkubationszeit von 3 bis 3½ Tagen und bildet nur noch Schwanzsomiten, die kaudal der Hintergliedmaße liegen. Ab dem Stadium HH 20 entwickelt sich das sekundäre Neuralrohr (Schoenwolf et al., 1985). Stadium HH 21 ist an einer Krümmung des embryonalen Körpers nach ventral zu erkennen, welche sich von der Schwanzspitze bis in den lumbosakralen Bereich zieht. Die Inkubationszeit beträgt 3½ Tage. Die Somitenzahl wurde von Hamburger und Hamilton in Stadium HH 21 und auch in den folgenden Stadien nicht genannt. Anhand der Vorgabe der Inkubationszeit und der Annahme, dass sich alle 90 Minuten ein Somitenpaar bildet, bestehen hier 43 bis 44 Somiten. In Stadium HH 22 reichen die Somiten bis in die Schwanzspitze. Es werden ca. 4 weitere kokzygeale Somiten gebildet. Insgesamt existieren dann 44 bis 48 Somitenpaare. Die Inkubationszeit beträgt 3½ bis 4 Tage. Die Allantois erreicht den Kopf. Ab Stadium HH 23 ist der Embryo vom Nachhirn bis in den Schwanz nach ventral gekrümmt. Als weiteres wichtiges Erkennungsmerkmal wird nun die Form der Extremitäten zur Einteilung herangezogen. Diese wachsen nun stark in die Länge und sind nun genauso lang wie breit. Das Stadium HH 23 wird vier Tage inkubiert und bildet die letzten vier Somiten, womit die vollständige Somitenzahl von 49 bis 52 erreicht ist. Das Stadium HH 24 bildet nun als erstes keine neuen Somiten mehr. Es benötigt eine Inkubationszeit von 4½ Tagen und ist an den Gliedmaßen, welche länger als breit sind, zu erkennen. Ab Stadium HH 25 sind Ellenbogen und Knie erkennbar. Die Fingerplatte weist keine morphologisch sichtbaren Phalangen auf. Es wird 4½ bis 5 Tagen inkubiert. In Stadium HH 26 treten nach fünf Tagen Bebrütungsdauer die ersten Demarkationen der späteren Phalangen an der Finger- und Zehenplatte auf. Diese weiten sich im darauffolgenden Stadium HH 27 aus (5½ bis 6 Tage-Inkubation).

1.7.1 Tabelle Somitenstadien

	HH 17	HH 18	HH 19	HH 20	HH 21
mittlere Inkubationszeit	58 h (2,4 d)	72 h (3 d)	75 h (3,25 d)	79,5 h (3,3 d)	84 h (3,5 d)
Differenz Inkubationszeit	+ 14 h	+ 6 h	+ 4,5 h	+ 4,5 h	+ 6 h
Somitenanzahl	29 - 32	30- 36	37- 40	40- 43	43- 44
Differenz Somitenanzahl	+ 4	+ 4	+ 3	+ 1	+ 4

	HH 22	HH 23	HH 24	HH 25	HH 26	HH 27
mittlere Inkubationszeit	90 h (3,75 d)	96 h (4 d)	108 h (4,5 d)	114 h (4,75 d)	112 h (5 d)	118 h (5,25 d)
Differenz Inkubationszeit	+ 6 h	+ 12 h	+ 6 h	+ 6 h	+ 6 h	+ 6 h
Somitenanzahl	48	52	52	52	52	52
Differenz Somitenanzahl	+4	-	-	-	-	-

Dar. 4: Übersicht Embryonalstadien, Inkubationszeit, Somitenanzahl

1.8 Wissenschaftliche Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Form sich die Schwanzsomiten kompartmentieren. Die Arbeit soll als Vorlage für weitere experimentelle Untersuchungen am Hühnerembryo dienen. Es wurden die Stadien HH 17 bis HH 27 untersucht, da in diesem Zeitraum die Somitogenese im Schwanz beim Hühnerembryo stattfindet. Um die Fragestellung zu beantworten, wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze angewandt.

Pro Stadium wurden Serien von mikroskopischen Schnitten angefertigt, die miteinander verglichen wurden. Zuerst wurden die Somiten in Semidünnschnitten dargestellt, um die Morphologie in sagittaler und transversaler Ebene zu untersuchen.

Anschließend wurden anhand von Markern die einzelnen Somitenkompartimente in ihrer zeitlichen Erscheinung dargestellt. Dafür kamen die Techniken der In situ-Hybridisierung zur Darstellung von Sklerotom und Myotom zum Einsatz. Für die Zellen des Sklerotoms wurde das Markergen *Pax1* verwendet. Die Zellen des Myotoms wurden zum einen mit *MyoD*, zum anderen mit *Myf5* nachgewiesen. Das Auftreten der beiden nachgewiesenen Gene der Muskelzellen wurde miteinander verglichen.

In einem weiteren Experiment wurde die Technik der Immunhistochemie angewandt, um Muskelzellen durch das Anfärben von Proteinen nachzuweisen. Dabei wurde das Muskelprotein MF20 dargestellt.

Die Entwicklung des Hühnerembryos wurde zuvor schon in ähnlicher Weise untersucht. Eine Übersicht gaben Christ und Ordahl (1995). Hier wurden die Schwerpunkte der Betrachtung vor allem auf die thorakalen und lumbalen Bereiche des embryonalen Körpers gelegt. Der Bereich des später rudimentär bleibenden Schwanzes in Hinblick auf die Somitogenese ist hingegen noch relativ unbekannt. Es gibt noch keine Beschreibungen über die Somitenentwicklung dieser Region in der Literatur. Auch die Diskussion über die sekundäre Körperentwicklung (Holmdahl 1925) ist noch nicht beendet. Die Theorie der Einheitlichkeit und Kontinuität steht dem gegenüber und muss noch endgültig aufgeklärt werden. Die Neurulation unterscheidet sich im rostralen und kaudalen Embryo. Dementsprechend könnte es auch Unterschiede in der Entwicklung des paraxialen Mesoderms geben. Außerdem variiert die Mesodermausbildung in der Schwanzknospe zwischen den einzelnen Spezies und könnte sich beim Huhn in besonderer Weise darstellen.

Um genaue Angaben über die Somitendifferenzierung machen zu können, wurde die Anwendung der Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton gewählt (Stadien der Embryonalentwicklung beim Huhn, s.o.).

Als Somitenbezeichnung und Zählinheit wurden die Vorgaben von Christ und Ordahl benutzt. Hier werden die Somiten von kranial nach kaudal in arabischen Zahlen angegeben; von kaudal nach kranial wird in römischen Zahlen gezählt. Das jüngste Somitenpaar pro Stadium wird folglich S I genannt. Da es in älteren Stadien zu Somitenrückbildungen und -differenzierungen im kranialen Bereich kommt, und die Somiten deswegen nur ungenau zählbar sind, wurde hauptsächlich die römische Zählweise angewandt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Bebrütung

Zur Embryonengewinnung wurden Hühnereier der Rasse Weisse Italiener (*Gallus gallus domesticus*) des Lieferanten Firma Bronner (Freiburg i. Br.) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Um die gewünschten Entwicklungsstadien zu erhalten, wurden die Eier bei 37,8°C und 80% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Firma Ehret GmbH, Emmendingen, Typ KBM 6) inkubiert. Die Dauer der Inkubation erstreckte sich von 56 Stunden bis 4 ½ Tage.

2.2 Experimente und Methoden

2.2.1 Isolierung und Einteilung in Entwicklungsstadien

Unter Verwendung eines Leuchtkastens konnte nun die Lage der Luftkammer und die des Embryos ermittelt werden. Beide Positionen wurden mit Bleistift auf der Eischale markiert. Darüber hinaus war hier bereits eine Alterseinschätzung anhand der Embryogröße zur Kontrolle des Inkubationserfolges möglich.

Danach konnte das Ei in eine vorbereitete Kunststoffschale gelegt werden. Die Schale war mit geformter Aluminiumfolien ausgekleidet, die das Ei gegen Verrutschen sicherte. Ein Zellstofftupfer polsterte die Kontaktfläche aus. Unter Verwendung einer Spritze, welche mit einer großlumigen Injektionskanüle⁷ ausgestattet war, wurden nun 2 ml Eiweiß durch ein Loch am stumpfen Eipol abgezogen. Dadurch wurde die Position des im oberen Bereich des Eiweißes schwimmenden Embryos soweit abgesenkt, dass dieser beim Eröffnen des Eis nicht beschädigt werden konnte.

Mittels einer feinen Schere wurde jetzt eine runde Öffnung von ca. 2 cm Durchmesser in die von oben zugängliche Seite der Schale geschnitten. Nun wurde der Embryo mitsamt des Amnions aus den Eihäuten herauspräpariert und mit einem Sieblöffel entnommen. In einer Petrischale wurde der Embryo kurz zur Waschung in PBS geschwenkt und anschließend unter dem Mikroskop⁸ mit 2,0 bis 5,0 facher Vergrößerung betrachtet und von Vitellinmembran, Amnion und Allantois befreit. Besonders vorsichtig streifte man dazu mit zwei Pinzetten die

⁷ Injektionskanüle Braun® Sterican Gr. 2

⁸ Zur Verwendung kam ein Mikroskop vom Typ Leica MZ75 mit dazugehöriger Lichtquelle Typ Leica KL1500 LCD

den Embryo umgebenden Häute gegeneinander ab. Hierfür kamen Dumont-Pinzetten⁹ und Federscheren sowie Sieblöffel aus der Ophthalmologie¹⁰ zur Anwendung.

Alle auf diesem Wege gewonnen Embryonen wurden nun für die weitere Bearbeitung in 4 % PFA bei 4°C aufbewahrt.

Vorbereitend für die weitere Untersuchung wurden nun entsprechend dem Schema von Hamburger und Hamilton (1951) die Embryonen in Entwicklungsstadien eingeteilt. Im weiteren Textverlauf mit „HH“ benannt.

2.2.2. Semidünn-Schnitte

1) Einbetten

Die zuvor isolierten und in Paraformaldehyd aufbewahrten Embryonen wurden nun zur Einbettung in Kunstharz (Durcupan II®) vorbereitet.

Dafür wurde der Embryo in einem 2 ml fassenden Gefäß in PBS gewaschen. Insgesamt drei Mal wurde die Lösung gewechselt, um die Waschung zu optimieren. Als nächstes wurde ein Tropfen Osmium hinzugegeben, um später bei der Färbung der Schnitte bessere Farberfolge erzielen zu können. Das Gefäß wurde kurz geschwenkt. Anschließend wurde das Osmium mit PBS ausgewaschen. Nun folgte die Dehydratation mit Ethanol. Nacheinander wurde der Embryonen in hochkonzentriertem Ethanol je zehn Minuten belassen. Die Ethanolreihe begann mit 50 Prozent, darauf folgen 60, 70, 80, 90, 95 und schließlich 100 Prozent. Die Waschung mit 100% Ethanol wurde drei Mal wiederholt. Als nächstes wurde der Embryo ans Einbettmedium gewöhnt. Zuerst wurde er dafür in reinem Propylenoxid¹¹ getränkt. Zwei Mal musste die Lösung nach zehn Minuten gewechselt werden. Im nächsten Schritt wurde eine Mischung aus den Verhältnissen von 2/3 Propylenoxid und 1/3 Kunstharz hergestellt. Diese Flüssigkeit wurde nun zum Embryo zugegeben und ca. eine Stunde dort belassen, um eine bestmögliche Penetration in den Embryo zu gewährleisten. Anschließend wurde eine Mischung aus 1/3 Propylenoxid mit 2/3 Durcupan angesetzt und erneut eine Stunde abgewartet. Der Einwirkungsprozess erfolgte bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde der Embryo in reinem Kunstharz für zwei Stunden gebadet. Zunächst wurde das Medium nach zwei Stunden erneuert, dann nach vier Stunden und letztlich über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag konnten alle behandelten Embryonen je nach gewünschter Schnittrichtung (sagittal und transversal) eingebettet werden. Unter Verwendung einer

⁹A. Dumont & FILS, Schweiz, INOX 5

¹⁰Ophthalmologie-Besteck Firma Aesculap

¹¹Propylenoxid von Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Blockschablone¹² wurden Durcupanblöcke hergestellt. Zunächst wurde frisches Kunstharz in die Schablone eingefüllt. Anschließend wurden die Embryonen vorsichtig mittels Sieblöffel eingelegt. Die Ausrichtung konnte unter dem Mikroskop mit einer Pinzette präzisiert werden. Drei Tage mussten die Durcupanblöcke nun bei 56°C im Ofen aushärten.

2) *Schnittrichtung*

Die Embryonen wurden in sagittaler und transversaler Richtung geschnitten.

Sagittale Schnittrichtung: Um genaue Ergebnisse zu erhalten, mussten alle Somiten im Schnittbild zentral getroffen werden. Dafür war eine leichte Schrägstellung in Richtung des kaudalen Embryoendes des Blockes vor dem Messer erforderlich, da die kranial gelegenen Somiten größer als die kaudalen sind.

Die transversalen Schnitte waren aufgrund der Schwanzkrümmung im Embryo ab dem 19. Stadium an einem Embryo alleine nicht durchführbar. Es wurden mind. drei Embryonen pro HH-Stadium verwendet, um die jeweils jüngsten fünf Somiten transversal zu treffen.

3) *Schneiden*

Anschließend konnten Semidünn-Schnitte mit einer Schneidemaschine¹³ „Ultracut S“ angefertigt werden. Unter Verwendung eines Diamantmessers¹⁴ wurden die Blöcke mit einer Dicke von 0,75 µm geschnitten. Zuvor wurden die Kunstharzblöcke mit einem Glasmesser auf die richtige Winkelung der Schnittebene getrimmt. Mit einem Glasstäbchen konnten die Schnitte aufgenommen und auf einen angefeuchteten Objektträger gestrichen werden. Auf einer Heizplatte mit der Oberflächentemperatur von 80°C trockneten sie anschließend (ca. zehn Minuten).

4) *Färben*

Die Semidünnschnitte mussten vor der Färbung fixiert werden. Dazu wurde jeder Objektträger für zwei bis vier Sekunden durch die Flamme eines Bunsenbrenners¹⁵ gezogen. Danach wurden sie zur Färbung auf eine Heizplatte¹⁶ gelegt, um sie auf eine optimale Färbetemperatur von 100°C zu erhitzen. Nun wurden mehrere Tropfen Färbelösung auf den Objektträger aufgetragen, die fünf bis acht Sekunden einwirkten, bevor sie mit Wasser aus einer Spritzflasche abgewaschen wurden. Erneut musste der Objektträger auf der Heizplatte (100°C) trocknen.

Die mikroskopische Betrachtung erfolgte unter einem binokularen Mikroskop¹⁷.

¹² Flache Einbettungsgießform aus Silikonkautschuk, Firma Plano

¹³ Ultracut S von Leica, Reichert, Bensheim

¹⁴ hier verwendet: Drukker International Typ: Histo with trough 8mm - 45°, Article No VC 5860160

¹⁵ 70% Butan, 30% Propan, Usbeck Typ 1420, Kartusche 1430

¹⁶ ikamag Ret-G

¹⁷ Leica DMR

2.2.3 In situ-Hybridisierung

Die In situ-Hybridisierung der Wholemounts ermöglicht die Detektion von mRNA eines bestimmten Gens in einem intakten Embryo. Damit kann ein Bild über die Expression des Gens in Relation zur Anatomie des untersuchten Embryos gewonnen werden. Die Methode lässt auf zellbiologischer Ebene nur Schlüsse auf die Transkription eines Genes, jedoch nicht auf die Translation zu.

Prinzipiell beruht die Methode auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, doppelsträngige Moleküle zu bilden, wenn die Nukleinsäure-Abfolge zueinander passt. Die mRNA liegt als Einzelstrang in der Zelle vor. Gibt man einen markierten gegensinnigen Strang eines bestimmten Gens hinzu, bildet dieser mit der entsprechenden mRNA einen Doppelstrang. Somit wird der markierte Strang in dieser Zelle fixiert, während er aus mRNA-negativen Zellen wieder ausgewaschen wird. Eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion macht die Bindung des markierten Gegenstranges sichtbar.

1) Protokoll

Das hier verwendete Protokoll für die *Pax1*, *MyoD* und *Myf5* In situ-Hybridisierung von Nieto et al. (1996) wurde leicht modifiziert. Die Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte wird in der folgenden Tabelle dargestellt.

Arbeitsschritte	Anzahl/Zeit	Temp.
I. Vorbehandlung der Embryonen		
- Präparation der Embryonen in PBT		
- Fixierung der Embryonen mit 4% PFA in PBT	über Nacht	4°C
- Waschen in PBT	1 x 15 min	4°C
- Enzym-Verdau mit Proteinase K (20µl/ml) in PBT	1 min/StadiumHH	RT ¹⁸
- Waschen in PBT	1 x 10 min	4°C
- Fixierung in 1% Glutaraldehyd in 4% PFA in PBT	1 x 20 min	4°C
- Waschen in PBT	1 x 10 min	4°C
- Prähybridisieren in Hybridisierungspuffer	90 min	65°C
- Hybridisierungspuffer erneuern	über Nacht	65°C

¹⁸ RT= Raumtemperatur

II. Hybridisierung		
- Hinzufügen der RNA-Sonde zum Hybridisierungspuffer (1,5 µl Sonde/1,5 ml Puffer)	2 Tage	65°C
III. Waschen		
- Waschen in 2fach SSC ohne CHAPS	1 x 20 min	65°C
- Waschen in 2fach SSC mit CHAPS (CHAPS:SSC = 1:50)	2 x 20 min	65°C
- Waschen in 0,2fach SSC mit CHAPS (CHAPS:SSC = 1:50)	2 x 20 min	65°C
- Wechsel in KTBT	1 x 5 min	RT
IV. Immunhistochemischer Sondennachweis		
- Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10% Lammserum in KTBT	1 x 4 h	RT
- Inkubation mit Antikörperlösung (anti-DIG)	über Nacht	4°C
- Waschen in KTBT	6 x 2 h	RT
- Waschen in KTBT	über Nacht	4°C
- Waschen in AP-Puffer	2 x 15 min	RT
- Inkubation mit der Färbelösung (vor Licht geschützt)	nach Bedarf	RT
- Waschen in AP-Puffer	über Nacht	4°C
- Refixierung in 4% PFA in PBS		

2) Vibratomschnitte

Um die Anfärbung bestimmter Somitenkompartimente auch transversal beurteilen zu können, wurden die Wholemounds geschnitten.

In einer erhitzten 4% Agarlösung wurden die Wholemounds eingebettet und mittels Pinzette in Position gebracht. Innerhalb von 20 Minuten erkaltete das Einbettmedium und der Block konnte mit Sekundenkleber auf der Grundplatte des Vibratoms¹⁹ fixiert werden. Das Schneidebecken wurde mit Wasser gefüllt. Zum Schneiden wird eine handelsübliche Rasierklinge verwendet. Mit dem Vibratom wurden nun 35µm dicke Schnitte in der Transversalebene angefertigt und die Serie an Schnitten lückenlos auf Objektträger mit einem feinen Pinsel aufgezogen. Die angefeuchteten Objektträger mussten nun auf eine Heizplatte bei sanfter Hitze (30°C) zum Trocknen aufgelegt werden.

Anschließend wurden die Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt.

¹⁹ Vibratom von Leica VT100S

Für die älteren Stadien (ab HH 23) wurde ein weiteres Einbett-Medium verwendet, um den Embryonen während des Schneidens besseren Halt zu verschaffen. Hierfür wurde eine Gelatin-Albumin-Mixtur angewandt. Zuerst wurden die Embryonen in diese Lösung (2 ml in einem 5 ml Gefäß) gegeben und über Nacht bei 4°C stehen gelassen, um die Lösung bestmöglich penetrieren zu lassen. Am nächsten Tag wurden die Embryonen eingebettet. Dafür wurden zunächst 500µl der Gelatin-Albumin-Lösung in ein Eppendorf Röhrchen gegeben. Das offene Röhrchen wurde auf den Schüttler gehalten und 35µl Glutaraldehyd hinzu pipettiert. Ca. zwei Sekunden wurde das Gemisch weiter geschüttelt. Dann wurde es schnellstmöglich in ein ca. 5 ml fassendes Gefäß gegossen. In wenigen Sekunden härtete die Lösung aus. Auf diesen Untergrund wurde nun der Embryo platziert und schnittgerecht ausgerichtet. Die noch dem Embryo anhaftende Flüssigkeit (PFA) wurde sorgsam mit einer Pipette abgesaugt. Nun wurde die Lösung erneut mit doppelter Menge (1 ml Gelatin-Albumin-Lösung, 70 µl Glutaraldehyd) angesetzt und schnell auf den Embryo gegeben. Anschließend ließ man die Lösung ca. eine Stunde bei Raumtemperatur aushärten. Danach konnte der Block aus dem Gefäß gelöst werden. Das Schneiden des Blockes wurde wie bei der Agar-Einbettung mit dem Vibratom vorgenommen. Die Schnittdicke betrug auch hier 35µm.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung

Zur Beschreibung des Myotoms kam die Immunhistochemische Färbung zur Anwendung. Hierbei nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen darzustellen. Um Myotomzellen sichtbar zu machen, benutzt man das Protein Myosin-Heavy-Chain als Antigen. Dieses wird durch den Antikörper MF20 gebunden. Um diese Bindung nachzuweisen, wird durch einen markierten sekundären Antikörper eine Färbung der betreffenden Anteile (Muskelzellen: quergestreift, glatt und Herz) erzielt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde Lammserum verwendet.

1) Protokoll

<i>Arbeitsschritte</i>	<i>Anzahl/Zeit</i>	<i>Temp.</i>
I. Vorbehandlung der Embryonen		
- Waschen in PBT	1 x 20 min	RT
- Enzym-Verdau mit Proteinase K (1 µl/1ml PBT)	1 x 5 min	RT
- Waschen in PBT	1 x 20 min	4°C
- Fixierung in 4 % PFA in PBT	1 x 2 h	4°C
- Waschen in KTBT	2 x 30 min	4°C
II. Blockierung unspezifischer Bindungen		
- Inkubation in 10 % Lammserum in Blocking solution	über Nacht	4°C
III. Antikörperreaktion		
- Überstand abnehmen		
- Inkubation mit primärem Antikörper MF20 gelöst in KTBT	über Nacht	4°C
- Überstand abnehmen, waschen in KTBT	5 x 1 h	4°C
- Inkubation mit KTBT	1 x 1 h	4°C
- Inkubation mit sekundärem Antikörper, gelöst in Blocking solution	über Nacht	4°C
- Waschen mit KTBT	6 x 1 h	RT
IV. Färbung		
- Waschen in AP-Puffer	1 x 15 min	RT
- Zugabe von NBT (2,5 µl/ml) und BCIP (2 µl/ml)	wenige Minuten	RT
- Stoppen der Färbereaktion: Waschen mit AP-Puffer	5 x	RT
- Fixierung in 4% PFA		

2.3 Fotografie

Mit einer Kamera von Leica Typ DFC 420 - aufgesetzt auf ein binokulares Mikroskop (Leica DMR) - wurden die Schnitte in „Photoshop Elements“ fotografiert.

Gefärbte, ungeschnittene Embryonen (Wholemounds) wurden mit einem Leica MZ16 Stereomikroskop fotografiert.

Anschließend wurden alle Abbildungen mit der Bildbearbeitungssoftware „Adobe Photoshop 10.0“ bearbeitet und beschriftet.

2.4 Chemische Reagenzien und Zusammensetzung der Lösungen

2.4.1 Lösungen für die Präparation und Isolation der Embryonen

- 1) PBT: 0,1 % Triton X-100 (Sigma) in PBS
- 2) Paraformaldehyde (PFA) (Sigma): 10-fach PBS-Stammlösung:

72,0 g	NaCl	auf 2000 ml Aqua bidest. auffüllen
4,3 g	KH ₂ HPO ₄	
14,8 g	Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	

2.4.2 Lösungen für die Semidünnschnitt-Einbettung

- 1) PBS: s. o.
- 2) Osmium: 350 mOsmol, pH 7.4
 - 1% Kaliumbichromat
 - 1% Osmiumtetraxyd® (Firma Plano)
 - 0,85% NaCl
- 3) Propylenoxid:
 - „Propylene oxide“, C₃H₆O (Firma Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg)
- 4) Kunstharz: Durcupan® (Firma Fluka Chemie AG, Schweiz):

8,0 ml	A/M „Epoxyharz“	Fluka Chemie AG, Schweiz	kräftig rühren auf 4°C abkühlen
12,0 ml	B “single component”		
0,3 ml	C “Beschleuniger 960”		
0,1 ml	D „Weichmacher“		

2.4.3 Farblösung für die Semidünnschnitte

1 g Azur II	mit 100 ml Aqua dest. auffüllen mischen filtrieren
1 g Na-Tetraborat	

2.4.4 Lösungen für die Wholemout-In situ-Hybridisierung und Immunhistochemie

- 1) Paraformaldehyd (PFA) (Sigma): s.o.
- 2) PBS-Tween: s. o.
- 3) PBT: s.o.
- 4) Proteinase K -Stammlösung: 20 mg/ml Proteinase K (Sigma) in PBT
- 5) Glutaraldehyde-Stammlösung: 25% Glutaraldehyde (Sigma)
- 6) Hybridisierungspuffer:

2% Blockierungspuffer (Boehringer) 0,1% Triton X-100 0,1% CHAPS (Sigma) 1 mg/ml tRNA 5 mM EDTA 50 µg/ml Heparin	in 1 : 1 Formamid : 5fach SSC
--	--------------------------------------

- 7) 20fache SSC-Stammlösung:
3M NaCl + 0,3M Natrium-Citrat; pH 7.0
- 8) KTBT-Lösung:
50mM Tris-Hel, pH 7.5 + 150mM NaCl + 10nM KCl + 1% Triton X-100
- 9) AP-Puffer:

5,0 ml	1 M Tris-Puffer pH 9,5	mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen
2,5 ml	1 M MgCl ₂	
1,0 ml	5 M NaCl	
2,0 ml	Triton X-100	

10) Färbelösung:

4,5 µl/ml	NBTm	Boehringer	in AP-Puffer gut lösen (Schüttler)
3,5 µl/ml	BCIP	Boehringer	

11) CHAPS-Lösung:

10 g Trockensubstanz in 100 ml Aqua bidest.

12) 1M Tris-Puffer-Stammlösung:

121,1 g Tris	Tris in 800 ml Aqua bidest. auflösen, pH-Einstellung mit konzentrierter HCl, auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen
1000 ml Aqua bidest.	
HCl	

13) *Pax1*-Sonde:

Die Pax1-Sonde ist als ein 1,5 kb Insert in den Vektor pBluescript II KS(Ebensperger et al. 1995) einkloniert. Sie wurde durch In-vitro-Transkription mit Digoxigenin-UTP nach dem Protokoll der Firma Roche markiert (DIG RNA Labeling Mix, 10x konz., Best.Nr. 1277073).

14) *Myf5*-Sonde:

Konstruktion: CMYF5 in Eco site of Stratagene pKS+

15) *MyoD*-Sonde²⁰:

Konstruktion: Stratagene pKS+ with 1518bp CMD insert in EcoRI site

16) Lammserum (Serva)

17) BSA: Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin) (Serva)

18) primärer Antikörper: MF20 Epitope: Myosin, Sarkomer, (DSHB)

19) sekundärer Antikörper: Gam-AP „Alkaline Phosphatase goat anti-mouse IgG (H+L), Firma Dako

20) Blocking solution: 2% BSA in PBT

²⁰ Referenz: Lin, Z.Y. et al, Genes and Development 3;986-996, 1989

2.4.5 Lösungen für die Vibratome-schnitt-Einbettung

1) Agar: 4g Agar Granulated in 100ml Aqua dest.

4,0 g Agar Granulated	Firma Becton Dickinson	in 100 ml Aqua dest. lösen
-----------------------	------------------------	----------------------------

2) Gelatin-Albumin:

0,55 g Gelatin	Gelatin from porcine skin, Type A, Sigma	in 450 ml PBS
33,75 g BSA	Bovine Serum Albumine Rinderserumalbumin, Serva	
22,5 g Saccharose	Saccharose, Sigma	

Zuerst wurden einige Milliliter PBS in die Gelatine gegeben und zur Quellung belassen.

Danach wurde der Rest des PBS auf 65°C erhitzt. Die Gelatine wurde hinzugegeben und bis zur vollständigen Lösung verrührt. Danach wurde BSA in das abgekühlte Gemisch gegeben.

Zur kompletten Lösung wurde das Gemisch über Nacht auf einem Magnetrührer belassen.

Anschließend wurde die Saccharose zugegeben und weiter gerührt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Semidünnschnitte

Anhand der Semidünnschnitte in sagittaler und transversaler Schnittebene ließ sich der Abschnürungsprozess von der Segmentplatte und somit die Bildung der Somiten darstellen. Durch die Betrachtung des kaudalen Schwanzbereichs in verschiedenen Stadien (nach Hamburger und Hamilton) ließ sich außerdem der zeitliche Ablauf der Somitenreifung untersuchen.

In Stadium HH 17 ist der jüngste Somit I im sagittalen Schnitt in epithelialer Form zu erkennen. Die Darstellung in transversaler Schnittebene zeigt ihn nur in annähernd runder Form. Der Somit ist keilförmig, weist aber dennoch ein geschlossenes Epithel auf. Ähnlich verhält es sich mit dem nebenliegenden Somiten II: Er ist keilförmig und weist an dorsaler, medialer und ventraler Seite einen epithelialen Saum auf. Auffällig ist, dass an der lateralen Seite dieser epitheliale Saum unterbrochen ist. Es handelt sich um ein mehrreihiges einschichtiges Epithel. Mittig liegen die Zellen des Somitozöls in aufgelockertem Zellverband. An der lateralen Seite reichen die ähnlich aufgelockerten Zellen in ventro-laterale Richtung. Diese erstrecken sich bis an den Wolff'schen Gang. Somit III des Stadiums HH 17 weist dorsal, lateral und medial ein unverändertes Epithel auf. Im ventralen Bereich sieht man hingegen den Beginn der Mesenchymalisierung: Die Zellen bewegen sich von einander fort. Die Interzellularspalten werden größer.

Mit Somit I und II des Stadiums HH 18 verhält es sich folgendermaßen: Beide Somiten sind nicht vollständig epithelial, wie im Transversalschnitt zu sehen ist. Auch hier befinden sich im lateralen Somitenteil locker angeordnete Mesenchymzellen anstelle eines geschlossenen Epithels. Die Mesenchymzellen dehnen sich bis an den Rand des Wolff'schen Ganges aus.

Ebenso verhält es sich mit Somit III (Transversal-Schnitt) in Stadium HH18, welcher sich im epithelio-mesenchymalen Übergang befindet. Im Sagittalschnitt des Somiten III befinden sich die ventralen Epithel- und Somitozölkzellen in aufgelockerter Form. Die Öffnung des Epithels im ventralen Bereich erweitert sich und die Somitozölkzellen wandern geringfügig auseinander. Anschließend verkürzen sich die beiden epithelialen Schenkel (lateral und medial) und sind später (Somit IV) nur noch als Dermomyotomlippen vorhanden. Somit IV ist folglich kompartmentiert.

In Stadium HH 19 liegt Somit I in leicht eckiger Form vor. Das Epithel ist nicht vollständig geschlossen. An der ventralen Seite ist das Epithel nach dorsal leicht eingedellt und lateral offen. Im transversalen Schnitt weist Somit II eine kugelförmige Gestalt auf und hat ebenfalls locker liegende Epithelzellen im ventrolateralen Bereich. Hier ist das Epithel nicht vollständig geschlossen. Der sagittal geschnittene Somit II hingegen ist weitgehend rund. Er weist nur gering aufgelockerte Zellen im Epithelsaum auf. Der Übergang zum kompartimentierten Zustand beginnt ab Somit III. Hier ist eine beginnende Auflockerung im ventrolateralen Epithelabschnitt zu beobachten, da mesenchymale Zellen aus dem Somitozöl nach ventral auswandern. Somit IV ist weiter gereift und besitzt Dermomyotom und Sklerotom.

Stadium HH 20: Die beiden jüngsten Somiten des Stadium HH 20 sind vollständig epithelial. Sie sind in ihrer Form leicht dreieckig bzw. weisen im ventralen Bereich des Epithels eine leichte Einbuchtung auf - ähnlich wie in Stadium HH 19. Auch Somit III besitzt diese Einbuchtung (transversale Ansicht) bzw. ein aufgelockertes Epithel im ventralen Bereich (sagittale Ansicht). Somit IV ist kompartimentiert.

In Stadium HH 21 und HH 22 sind Somit I und II kugelförmig und geschlossen epithelial. Somit III beider Stadien zeigt eine beginnende Auflockerung des epithelialen Saums an der ventrolateralen Seite. Anstelle des Epithels befindet sich hier eine Ansammlung mesenchymaler Zellen. Der Somit befindet sich im Beginn der Kompartimentierung. Die Somiten IV und V sind vollständig kompartimentiert und besitzen deutlich sichtbar ein Dermomyotom und Sklerotom.

Stadium HH 23: Die Somiten I bis III des Sagittalschnitts sind in Stadium HH 23 epithelial, wobei Somit I, der sich gerade im Prozess der „Abschnürung“ von der Segmentplatte befindet, noch unregelmäßig epithelialisiert ist. Somit I und II zeigen eine praktisch runde Gestalt und einen geschlossenen Epithelsaum. In der Transversalansicht sieht man bei Somit II und III ventrolateral eine geringe Unterbrechung des Epithels. Somit IV ist kompartimentiert und besteht aus Dermomyotom und Sklerotom.

Stadium HH 24: Der jüngste Somit des Stadiums HH 24 ist epithelial. Die ventrale Somitenwand ist stark nach dorsal eingebuchtet, so dass sie die dorsale Epithelwand beinahe berührt. Das Somitozöl ist hier kaum vorhanden. In der Sagittalansicht weist Somit I kugelförmige Gestalt auf. Somit II ist eckig und besitzt lange Dermomyotomlippen. Das Somitozöl ist deutlich dargestellt und die mesenchymalen Zellen wandern in ventrale Richtung aus. Dieser Somit befindet sich im epithelio-mesenchymalem Übergang. Somit III ist vollständig kompartimentiert.

Stadium HH 25, HH 26 und HH 27: Somit I des Stadiums HH 25 zeigt im ventralen Bereich Mesenchymzellen. Die Dermomyotomlippen reichen weit nach ventral. Bei den älteren Somiten II, III und IV stellen diese sich kürzer dar. Alle Somiten der Stadien HH 25, 26 und 27 sind vollständig kompartimentiert. Die Formen dieser kompartimentierten Somiten sind sagittal betrachtet zunächst flach und entwickeln dann kurze Dermomyotomlippen. Transversal hingegen verkürzen sich die zunächst langen Dermomyotomlippen mit zunehmendem Alter. Dreidimensional betrachtet bedeutet das, dass die lateral und medial gelegenen Dermomyotomlippen sich verkürzen, wohingegen die kranial und kaudalen Dermomyotomlippen sich nach ventral strecken.

3.1.1 Bilder der Semidünnschnitte sagittal geschnitten

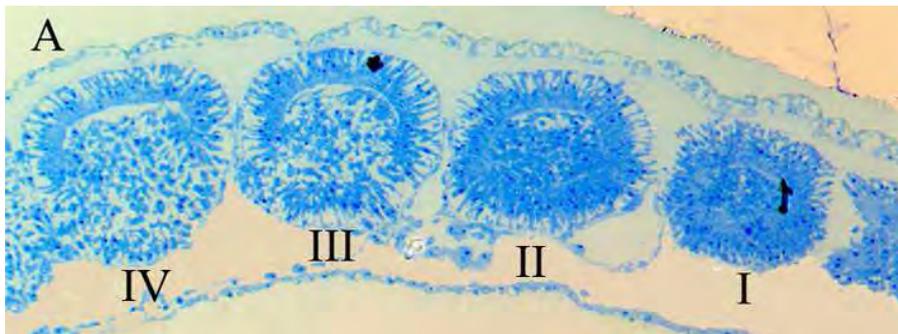


Abb. A:
HH 17
 sagittaler Schnitt durch Somit I epithelial, Somit II epithelial, Somit III im epithelio-mesenchymalen Übergang, Somit IV kompartimentiert

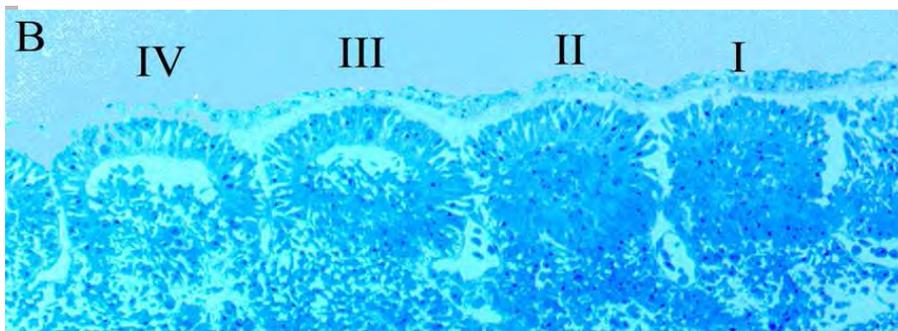


Abb. B:
HH 18
 sagittaler Schnitt durch Somit I epithelial, Somit II epithelial, Somit III kompartimentiert, Somit IV kompartimentiert

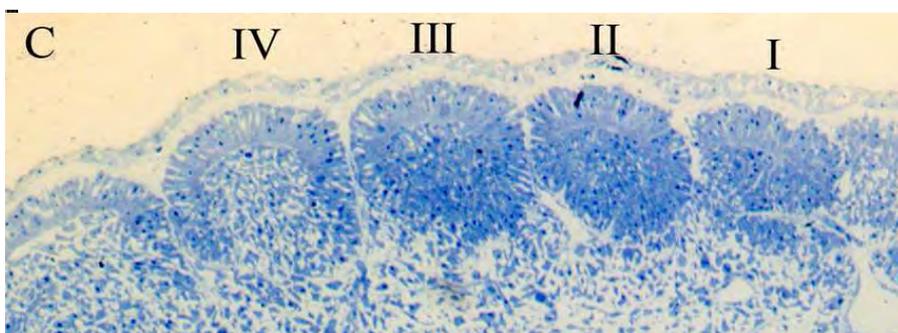


Abb. C:
HH 19, sagittaler Schnitt durch Somit I epithelial, Somit II epithelial, Somit III epithelio-mesenchymaler Übergang, Somit IV kompartimentiert

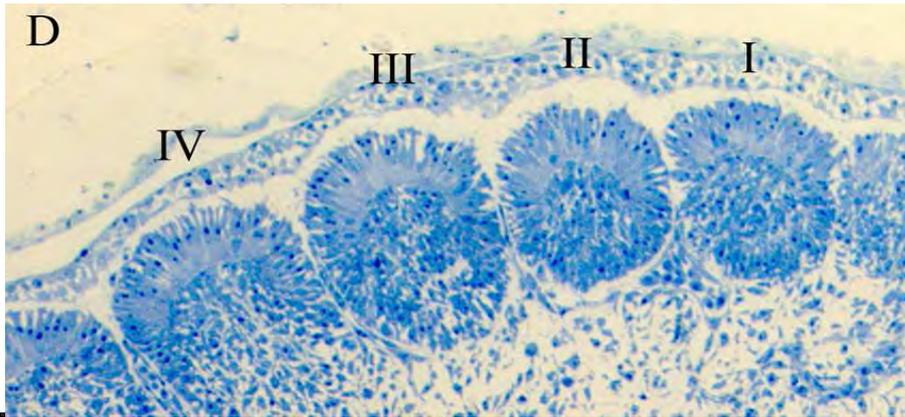


Abb. D:
 HH 20, sagittaler
 Schnitt durch Somit
 I epithelial, Somit II
 epithelial, Somit III
 epithelio-
 mesenchymaler
 Übergang, Somit IV
 kompartmentiert

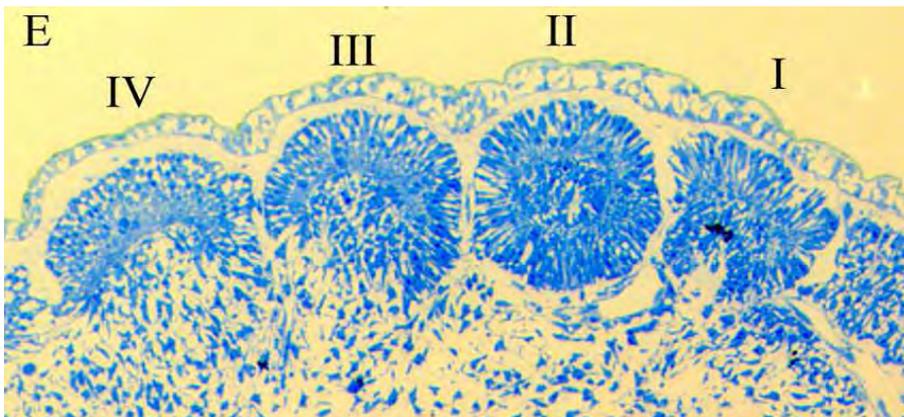


Abb. E:
 HH 21, sagittaler
 Schnitt durch Somit
 I epithelial, Somit II
 epithelial, Somit III
 kompartmentiert,
 Somit IV
 kompartmentiert

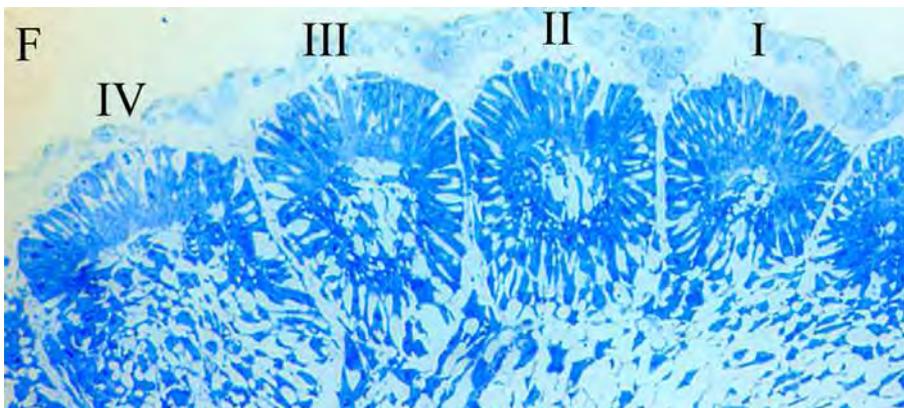


Abb. F:
 HH 22, sagittaler
 Schnitt durch Somit
 I und II epithelial,
 Somit III epithelial
 mit beginnender
 Auflockerung der
 ventralen
 Epithelzellen und
 Somit IV
 kompartmentiert

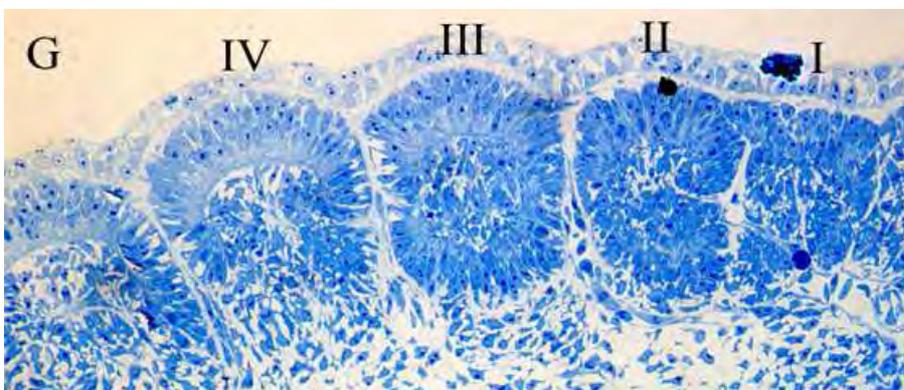


Abb. G:
 HH 23, sagittaler
 Schnitt durch Somit
 I epithelial, Somit II
 epithelial, Somit III
 epithelial und Somit
 IV kompartmentiert

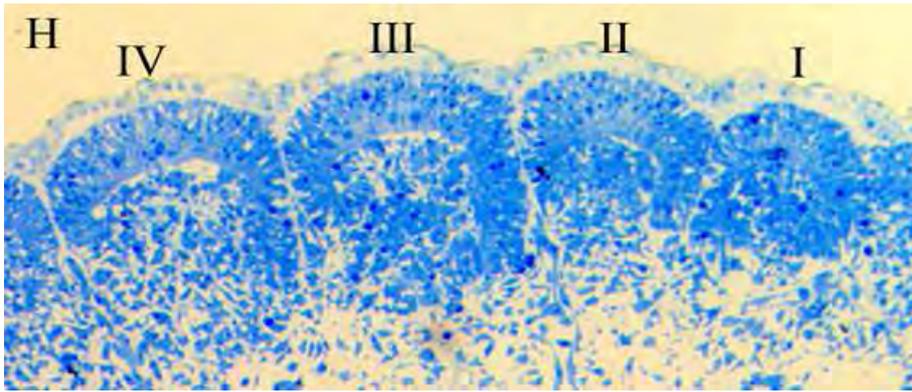


Abb. H:
 HH 24, sagittaler Schnitt durch Somit I epithelial, Somit II epithelio-mesenchymaler Übergang, Somit III kompartimentiert und Somit IV kompartimentiert

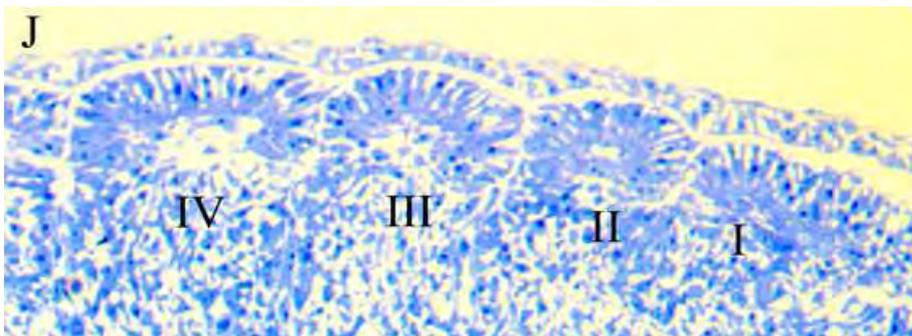


Abb. J:
 HH 25, sagittaler Schnitt durch Somit I, II, III, IV alle in kompartimentierter Form

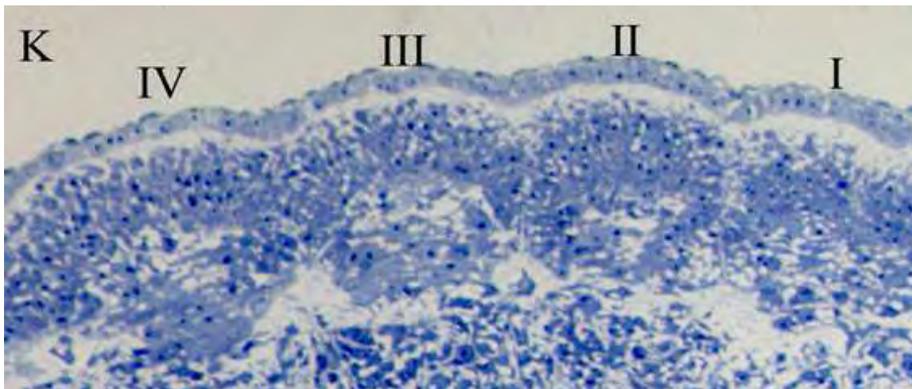


Abb. K:
 HH 26, sagittaler Schnitt durch Somit I, II, III, IV alle in kompartimentierter Form

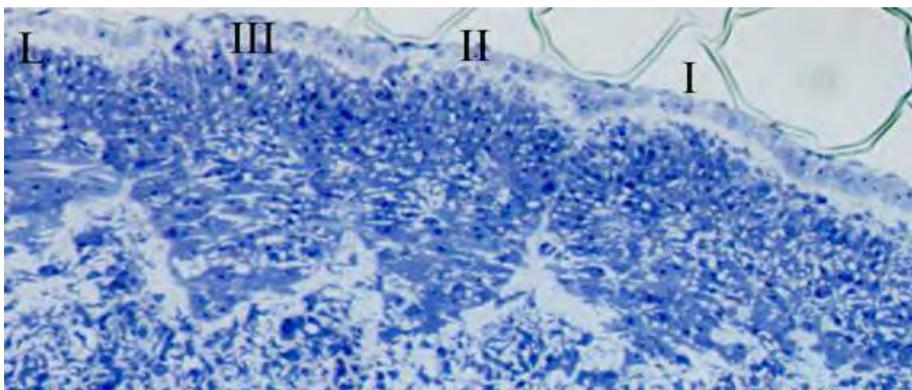
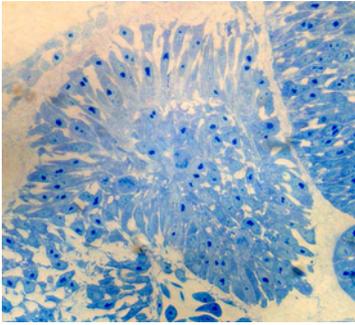
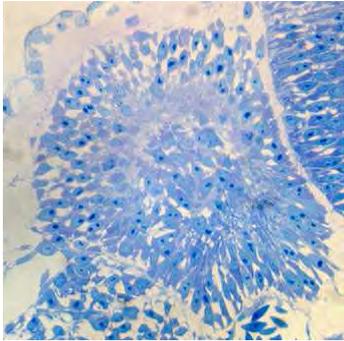
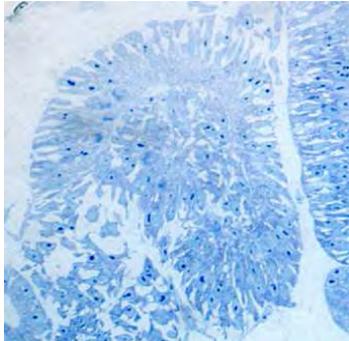
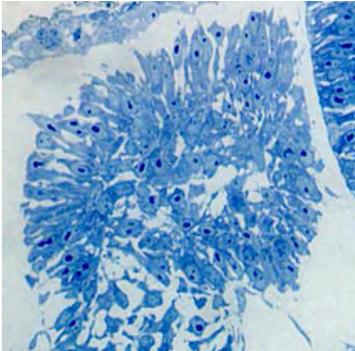
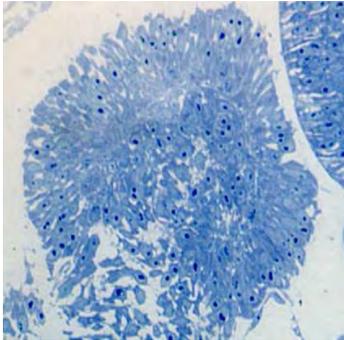
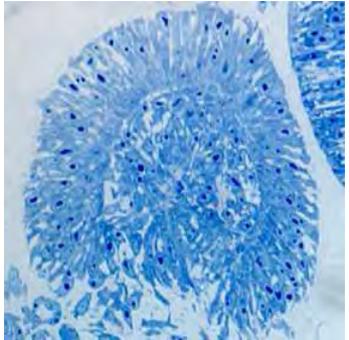
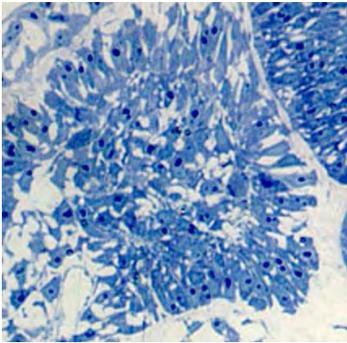
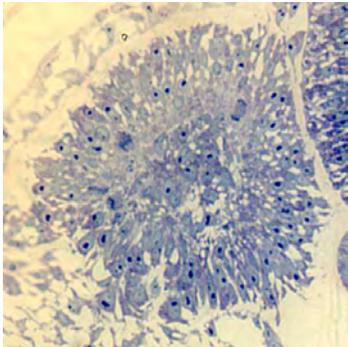
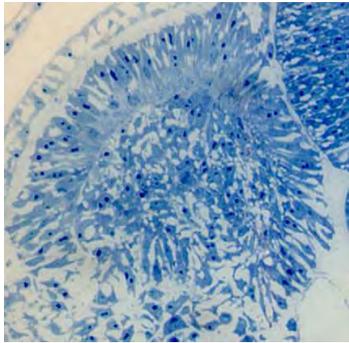
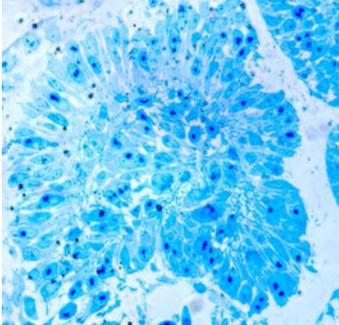
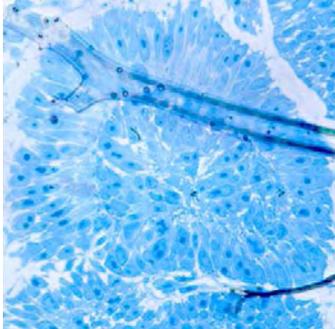
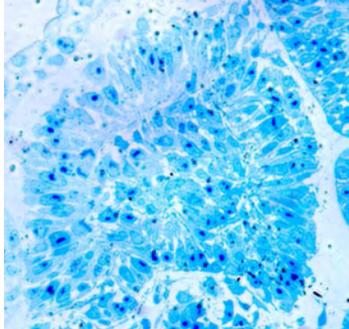


Abb. L:
 HH 27, sagittaler Schnitt durch Somit I, II, III alle in kompartimentierter Form

Dar. 5: Semidünnschnitte sagittal, HH 17 bis HH 27, Lichtmikroskop Vergrößerung 20fach

3.1.2 Bilder der Semidünnschnitte transversal geschnitten

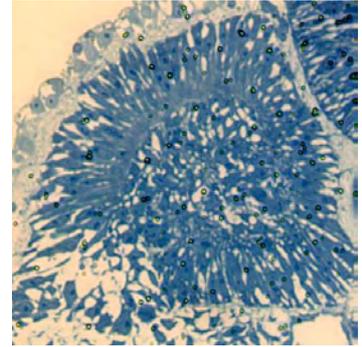
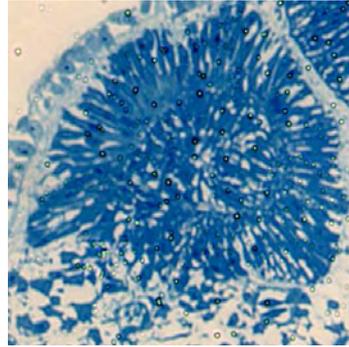
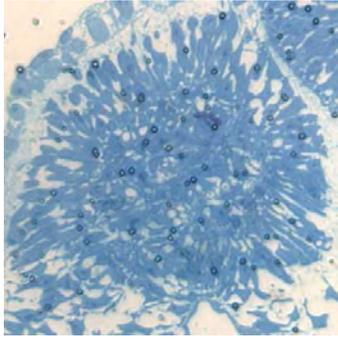
	Somit I	Somit II	Somit III
HH 17			
HH 18			
HH 19			
HH 20			

Somit I

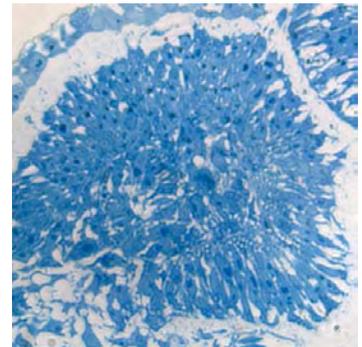
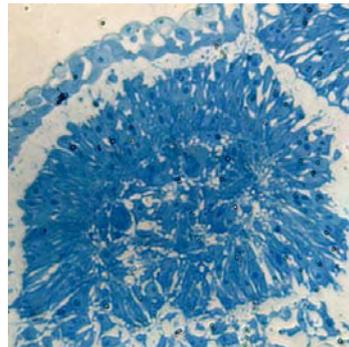
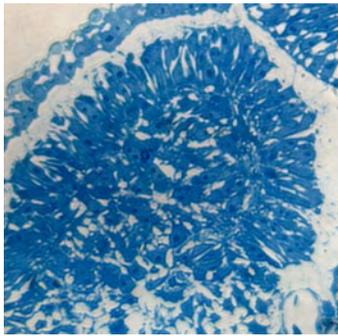
Somit II

Somit III

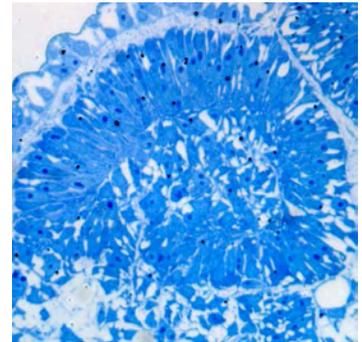
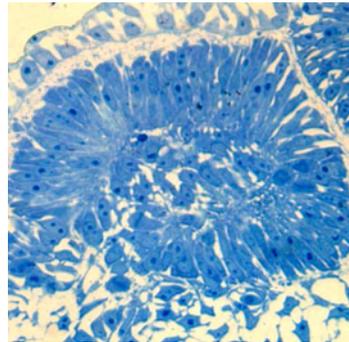
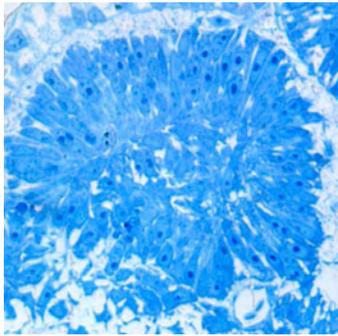
HH 21



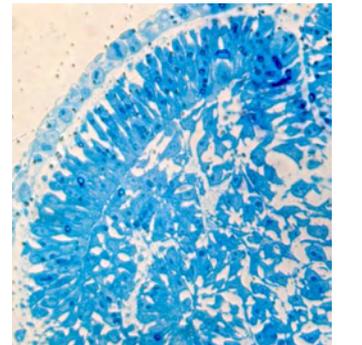
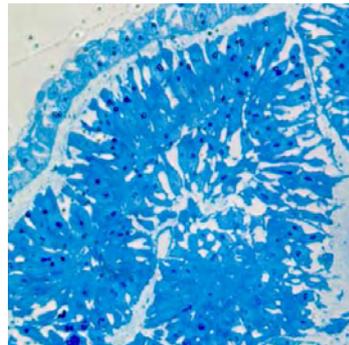
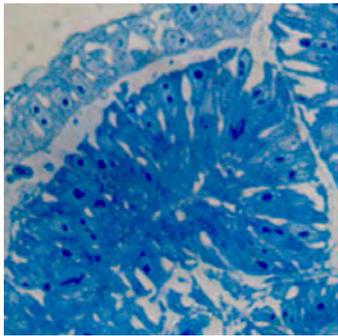
HH 22

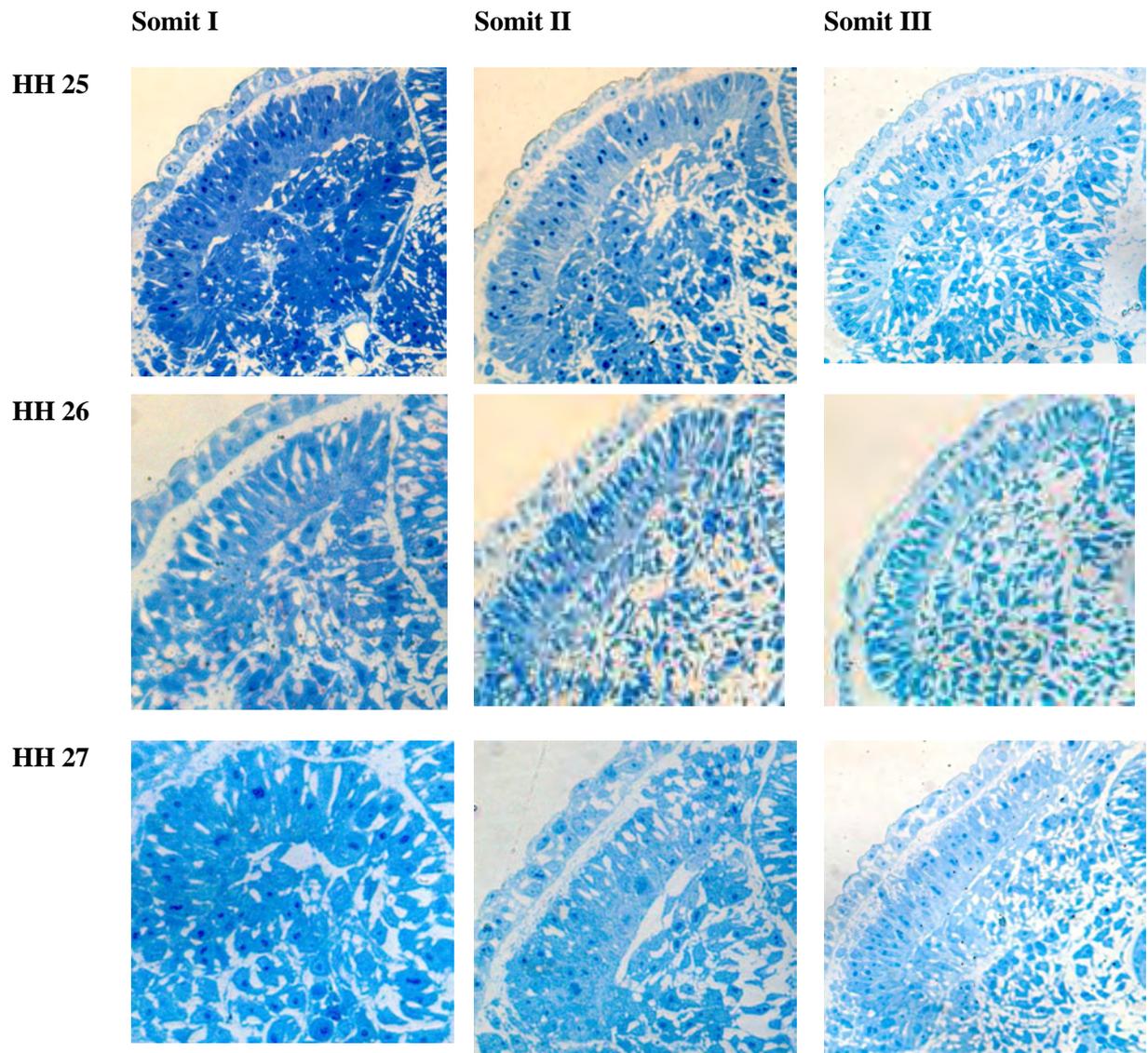


HH 23



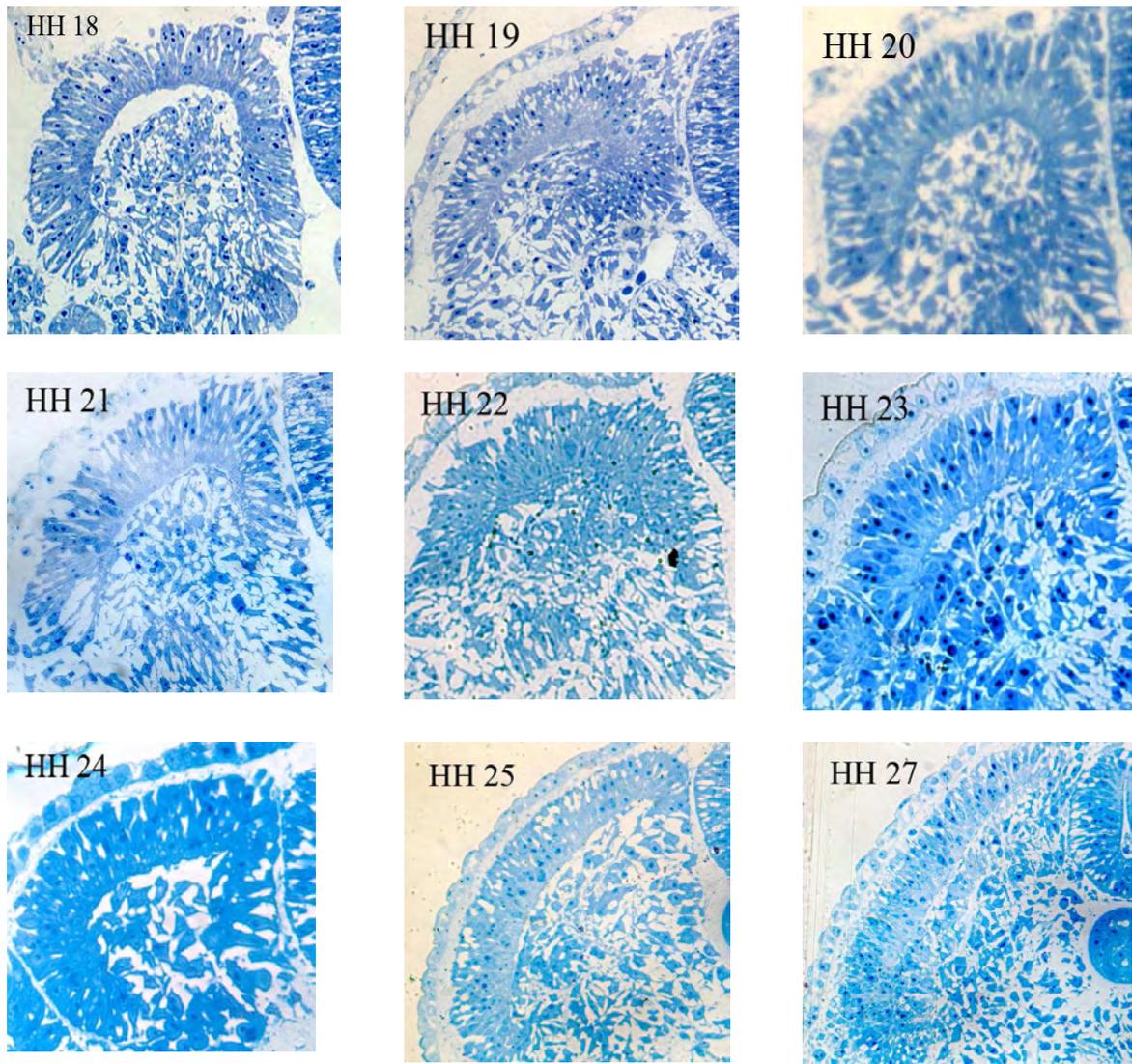
HH 24





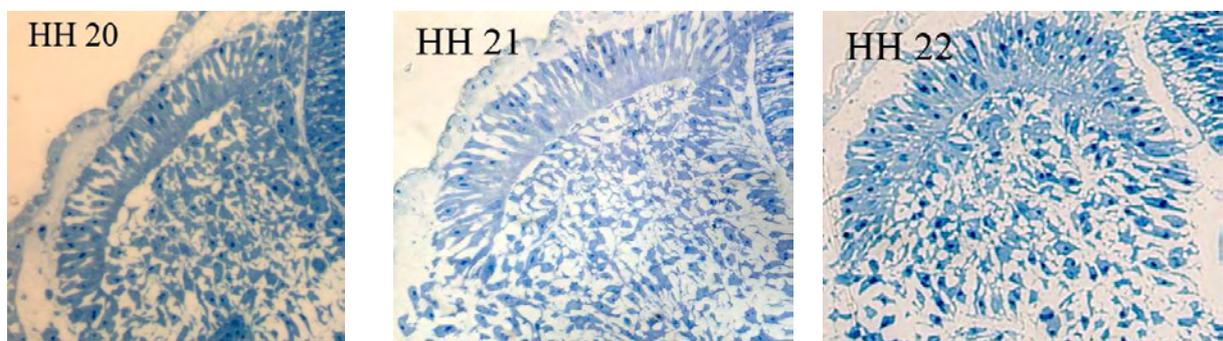
Dar. 6: Semidünnschnitte transversal, HH 17 bis HH 27, Somit I bis III, Lichtmikroskop, Vergrößerung 40fach

Somit IV in den Stadien HH 18 bis HH 27



Dar. 7: Semidünnschnitte transversal, HH 18 bis HH 27, Somit IV, Lichtmikroskop, Vergrößerung 40fach

Somit V in den Stadien HH 20, 21, 22



Dar. 8: Semidünnschnitt transversal, HH 20 bis HH 22, Somit IV, Lichtmikroskop, Vergrößerung 40fach

3.2 Ergebnisse der In situ-Hybridisierung:

3.2.1 Darstellung des Sklerotoms durch Pax1

Der Begriff „Sklerotom“ wurde von Hatschek (1880) eingeführt. Das Sklerotom ist sowohl durch seine mesenchymale Struktur als auch durch Expression von Sklerotom-spezifischen Marker-Genen charakterisiert. Dazu gehören *Pax1* und *Pax9*. *Pax9* wird ab dem Zeitpunkt der vollständigen Sklerotombildung exprimiert. Dagegen wird *Pax1* schon in ventromedial gelegenen Zellen des epithelialen Somiten exprimiert (Deutsch et al., 1988; Ebensperger et al., 1995; Balling et al., 1996; Muller et al., 1996; Borycki et al., 1997). Insgesamt gibt es neun vertebrate *Pax*-Gene. In dieser Arbeit wurde die Genexpression von *Pax1* zum Nachweis des Sklerotoms untersucht und mit dem mesenchymalen Charakter der Somitenbetrachtung aus den Semidünnschnitten verglichen. Durch die In situ-Hybridisierung mit *Pax1* entsteht eine blau-lila Farbreaktion im zentralen und ventralen Sklerotom, die im histologischen Schnitt und auch am ungeschnittenen Embryo (Wholemout) zu sehen ist. *Pax1* wird im zentralen und ventralen Sklerotom unter Kontrollen von *Sonic hedgehog* und *Noggin* exprimiert. Das dorsale und laterale Sklerotom wird im Gegensatz dazu von *Bmp4* kontrolliert und exprimiert folglich kein *Pax1*.

Stadium HH 17: Die jüngsten zwei Somiten des Stadiums HH17 exprimieren kein *Pax1*. Somit III weist einen zarten Farbeinschlag der *Pax1*-produzierenden Zellen auf. Somit IV zeigt eine deutlichere, die Somiten V und VI dagegen eine noch stärkere Expression. Diese befindet sich im ventromedialen Bereich des Sklerotoms, also dem zentralen und ventralen Sklerotom, wohingegen im lateralen und dorsalen Sklerotom keine Expression zu erkennen ist.

HH 18: Die Somiten I und II des 18ten Stadiums sind ungefärbt. Dagegen zeigen die folgenden Somiten III, IV und V eine deutliche *Pax1*-Expression. Ab Somit VI erstreckt sich die Expression auch in den weiter dorsal gelegenen Teil des zentralen Sklerotoms, wohingegen bei den jüngeren gefärbten Somiten das Signal ausschließlich im ventromedialen Bereich zu sehen ist.

In Stadium HH 19 verhält sich die Reihenfolge der *Pax1*-exprimierenden Somiten wie in Stadium 17: Die Somiten I und II zeigen keine Expression. Die Sklerotomzellen von Somit III exprimieren *Pax1* noch schwach. Somit IV und V wie auch die darauffolgenden älteren Somiten sind deutlich markiert.

In Stadium HH 20 erscheint die *Pax1*-Expression bei Somit III zum ersten Mal in schwacher Form. Die Somiten I und II zeigen keine Expression. Bei Somit IV und den folgenden älteren wird *Pax1* exprimiert, wobei die Intensität der Expression mit zunehmendem Alter steigt.

In Stadium HH 21 exprimieren die Somiten I und II noch kein *Pax1*. Bei Somit III stellt sich die *Pax1*-exprimierenden Zellen deutlich gefärbt dar. Ab Somit IV ist die Expression stark vorhanden und dehnt sich großflächig über das ventrale und zentrale Sklerotom aus.

In Stadium HH 22 ist der Differenzierungsprozess der Somiten weiter fortgeschritten. Hier zeigt lediglich Somit I noch keine Expression. Schon Somit II weist ventromedial ein mittelstark *Pax1*-exprimierendes Sklerotom auf. Die ebenfalls untersuchten Somiten III bis V sind stärker und großflächiger markiert.

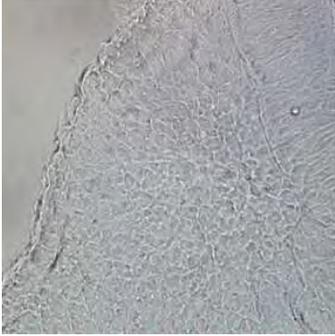
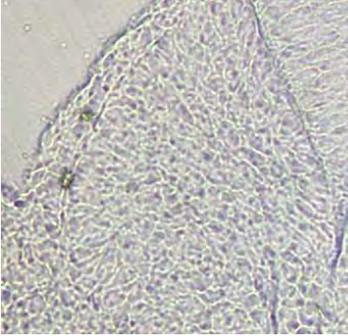
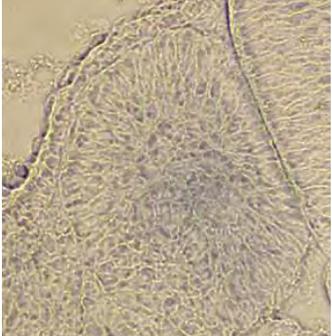
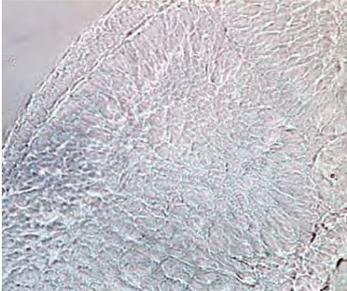
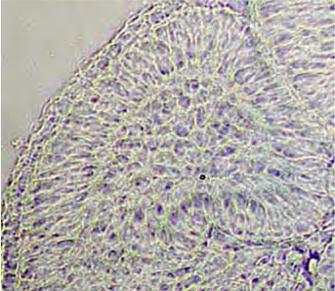
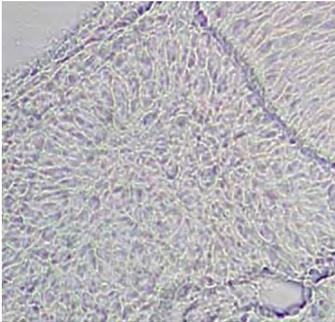
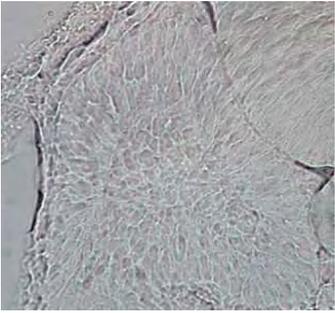
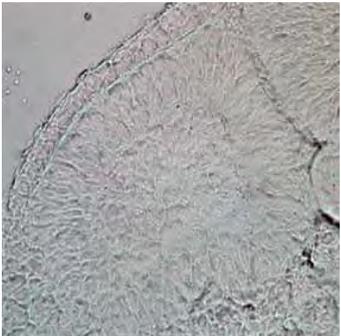
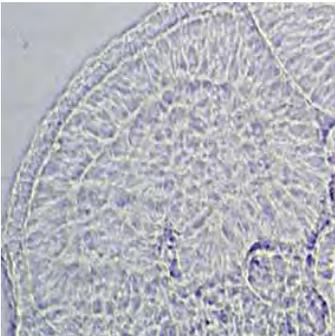
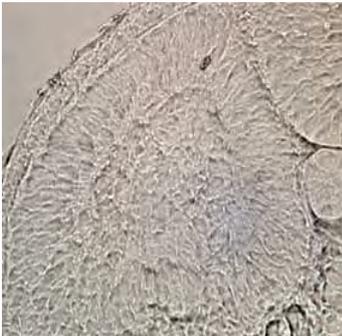
HH 23: Die Expression von *Pax1* ist in der Serie des Stadiums HH 23 vollständig bei allen Somiten vorhanden. Die Intensität des Farbeinschlages nimmt mit zunehmendem Alter der Somiten zu. Die Flächenausdehnung der Expression ist zu Beginn nur klein (ventrales Sklerotom), dehnt sich aber bei Somit III und IV über das zentrale Sklerotom aus.

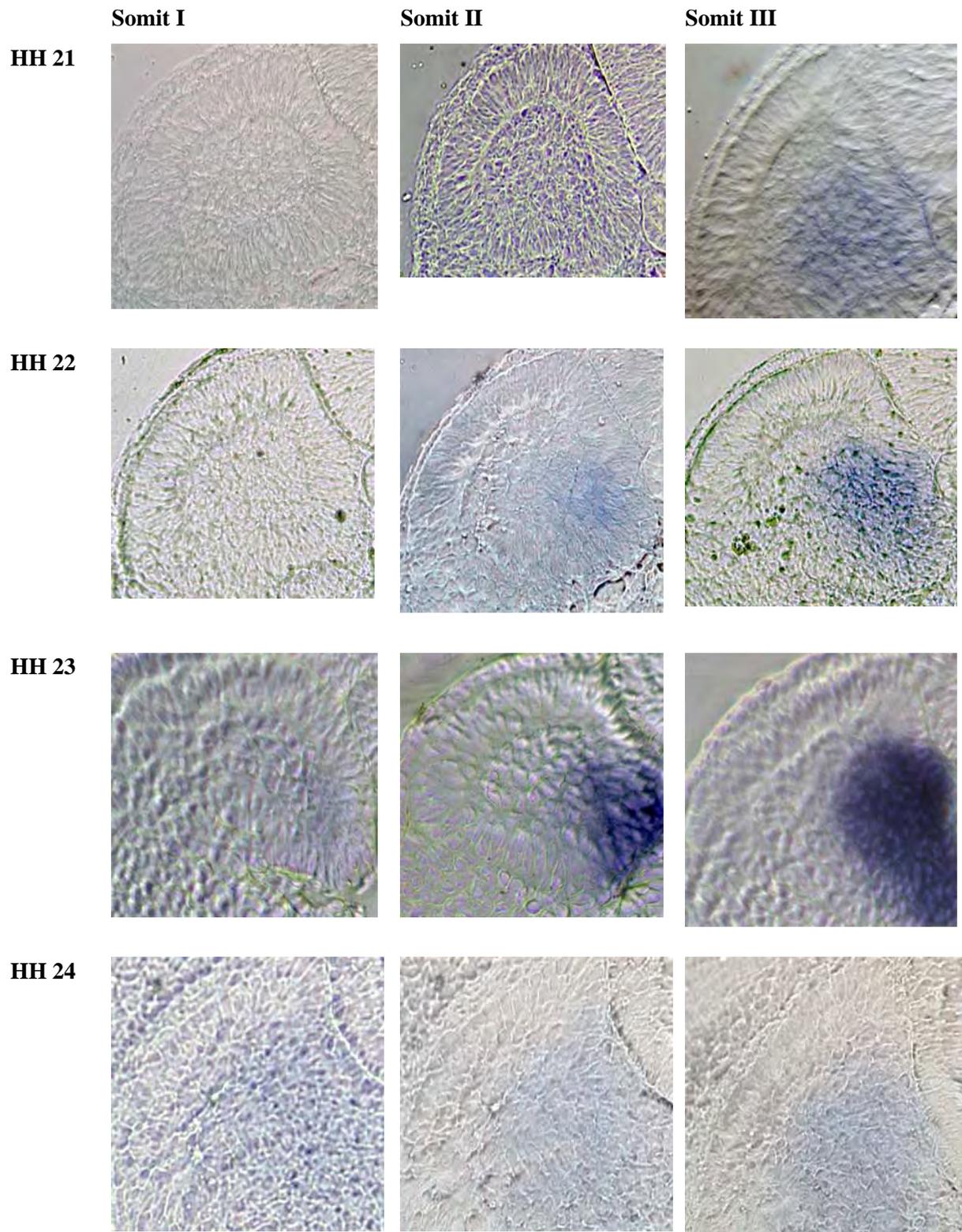
HH 24: In Stadium HH 24 zeigt nur Somit I eine schwache Expression. Somit II zeigt eine gering bis mittlere Färbung, während ab Somit III eine großflächige Expression zu sehen ist.

HH25: Schon Somit I des Stadiums HH 25 lässt die Expression von *Pax1* erkennen. Sie stellt sich allerdings noch kleinflächig und schwach gefärbt dar. Die älteren untersuchten Somiten II, III und IV weisen hingegen stärkere Signale auf. Hier erstreckt sich die Expression immer weiter nach ventral Richtung Chorda dorsalis sowie auch weiter ins zentrale Sklerotom.

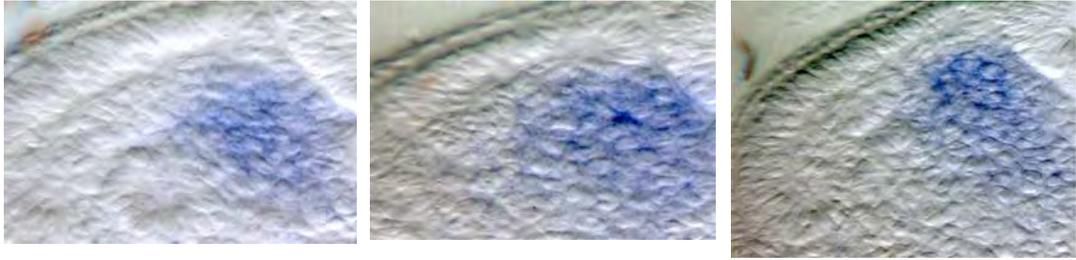
Auch in Stadium HH 26 und HH 27 gibt es keine ungefärbten Somiten mehr. Alle bestehen aus kompartimentierten Somitenbestandteilen und besitzen *Pax1*-exprimierende Zellen.

3.2.2 Bilder der Pax1-Ergebnisse transversal geschnitten

	Somit I	Somit II	Somit III
HH 17			
HH 18			
HH 19			
HH 20			



HH 25

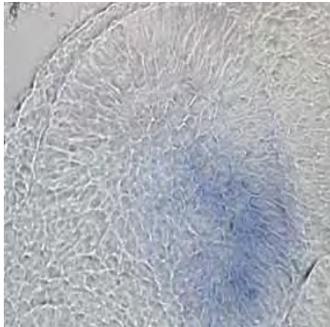


**Dar. 9: Vibratom-Schnitte HH 17 bis HH 25, Somit I bis III, Pax1-Darstellung, Lichtmikroskop
Vergrößerung 40fach**

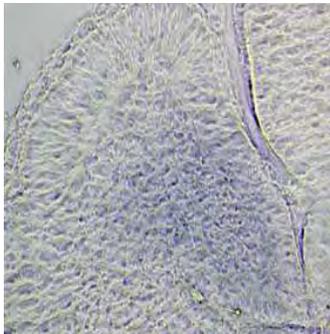
Somit IV und V in HH 17 bis 22

Somit IV

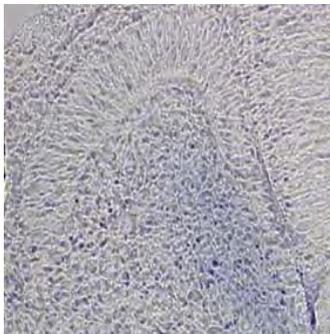
HH 17



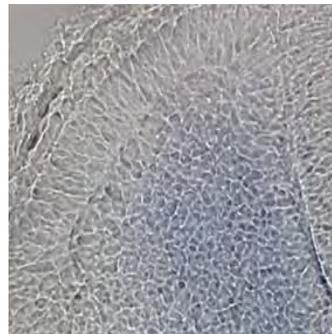
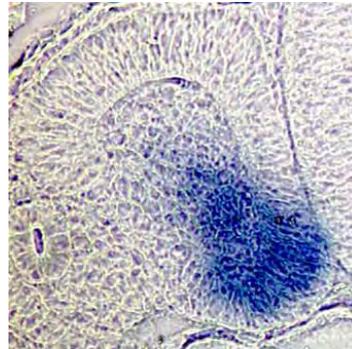
HH 18

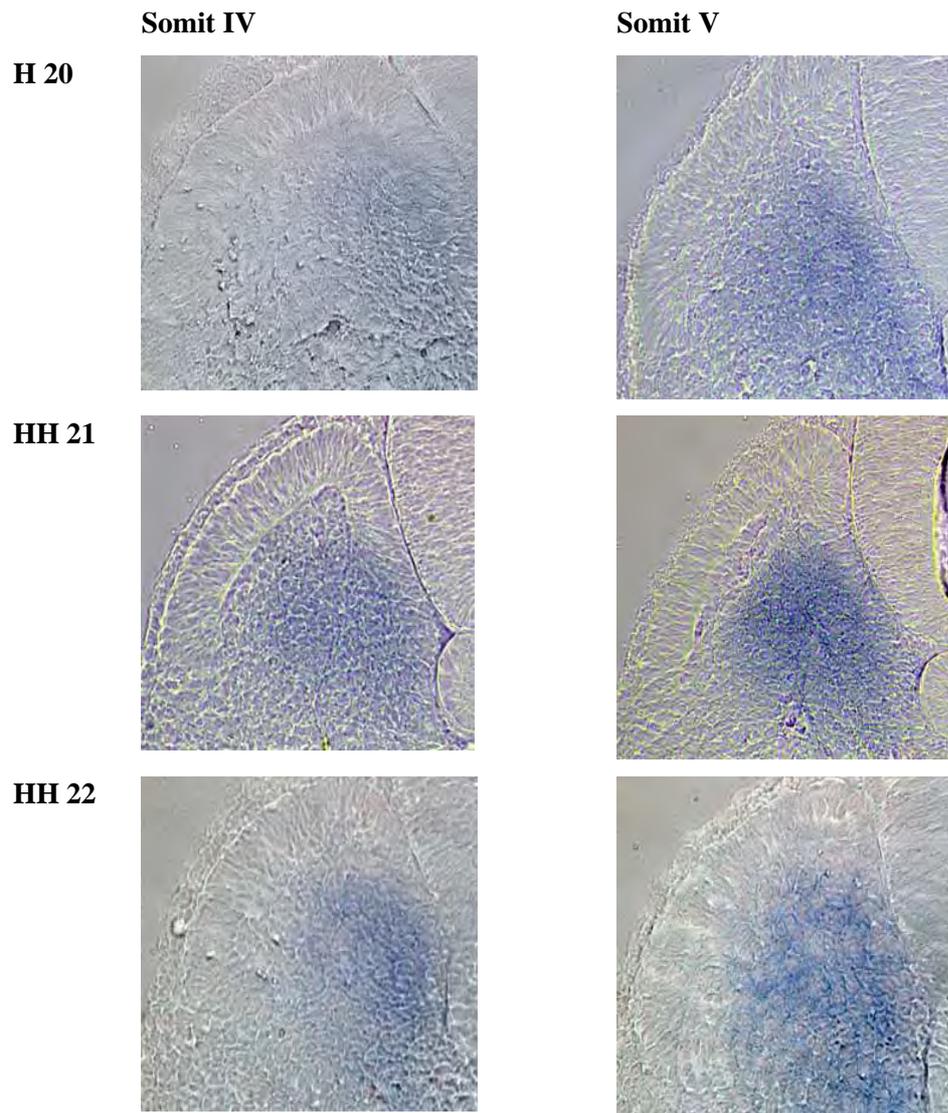


HH 19



Somit V

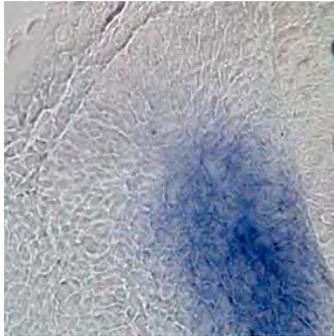




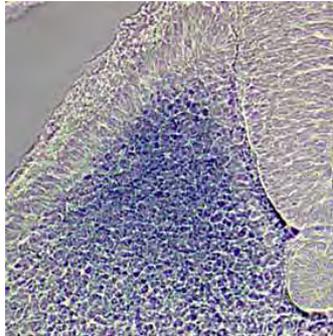
Dar. 10: Vibratom-Schnitte HH 17 bis HH 22, Somit IV und V, Pax1-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

Somit VI in Stadium HH 17, 20, 23

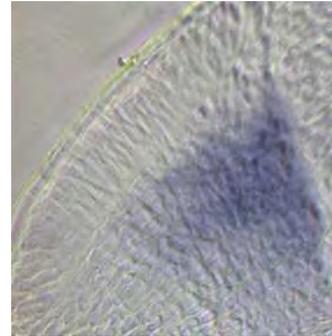
HH 17



HH 20



HH 23



Dar. 11: Vibratom-Schnitte HH 17, 20, 23, Somit VI, Pax1-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

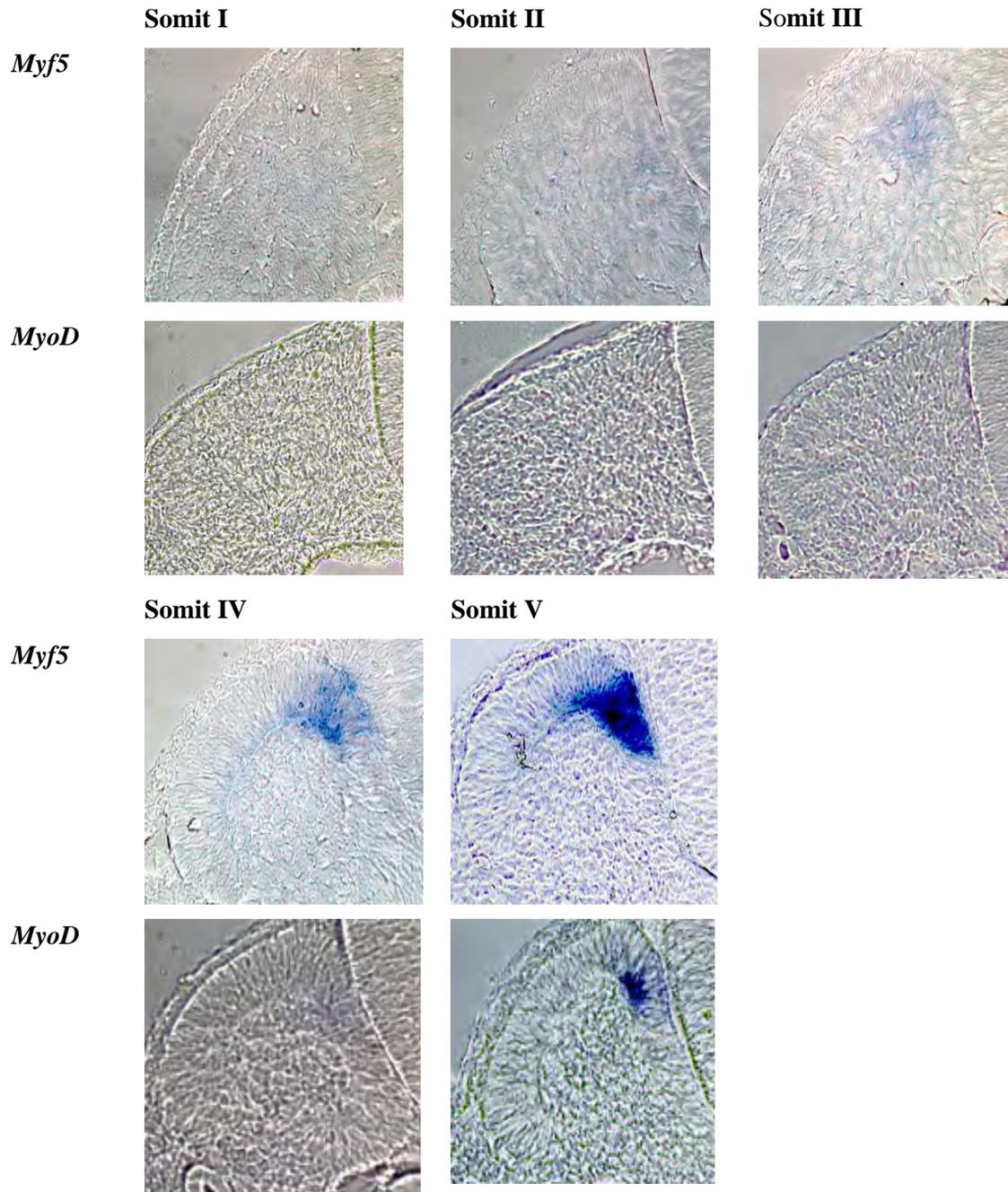
3.2.3 Darstellung des Myotoms durch *MyoD* und *Myf5*

Myf5 und *MyoD* kennzeichnen das Kompartiment „Myotom“ des Somiten (George-Weinstein et al., 1996). Das Myotom befindet sich ventral des Dermomyotoms und liegt diesem direkt an.

Die Expressionen von *MyoD* und *Myf5* der Somiten des Schwanzes unterscheiden sich in ihrer zeitlichen Erscheinung. Verglichen zum Auftreten *MyoD*-exprimierender Zellen, werden *Myf5*-exprimierende Zellen in einigen Stadien schon früher, teilweise später gebildet. Die Expression beginnt jeweils medial unter der DML und erstreckt sich erst spät unter das gesamte Dermomyotom.

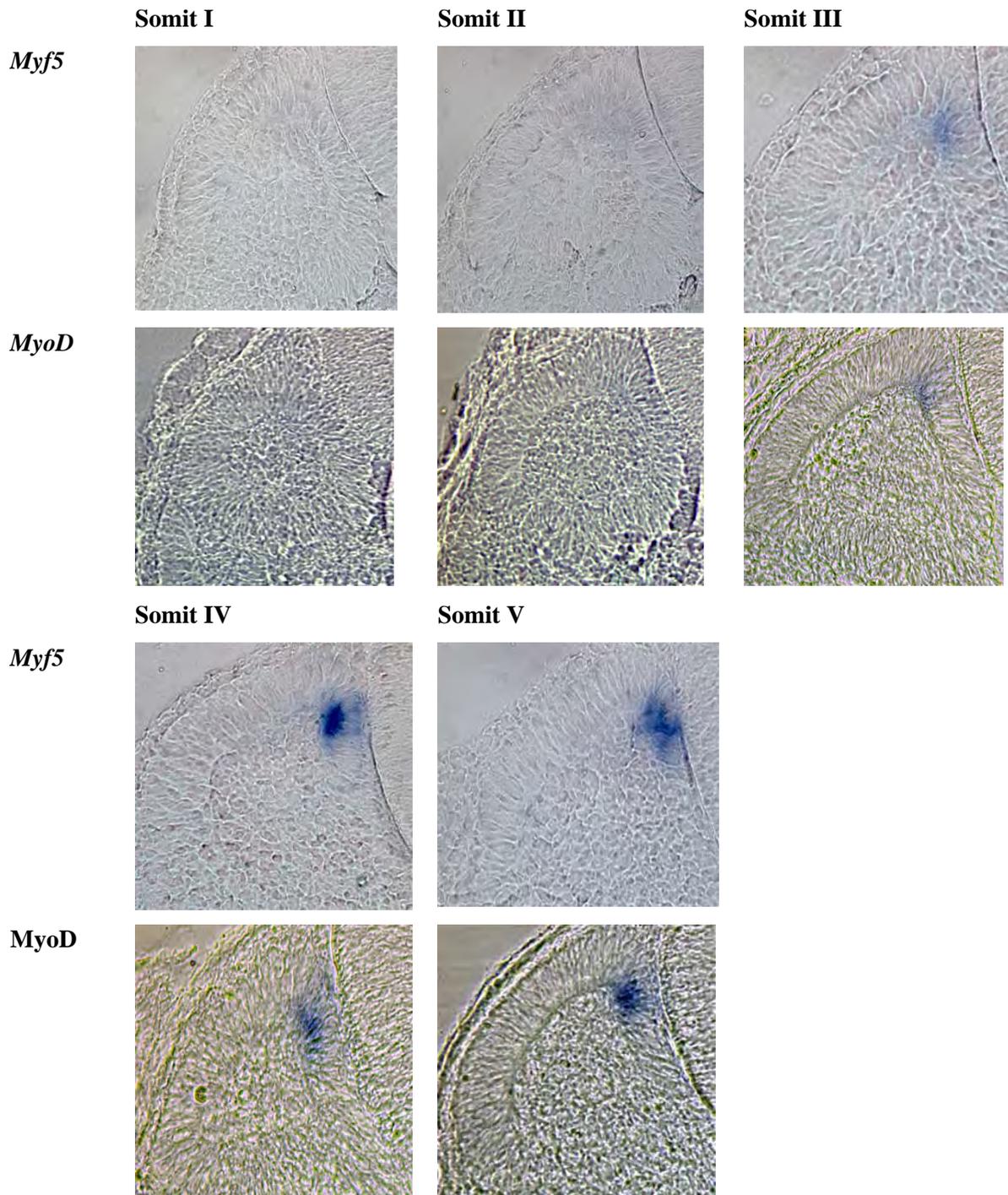
Die Bildung des Myotoms wird von umliegenden Strukturen und von deren Signalen beeinflusst. Diese Steuerung beginnt schon früh während des Zustandes des unsegmentierten paraxialen Mesoderms. Es gibt drei wichtige Komponenten, welche als Voraussetzung für die Myogenese gelten: das Neuralrohr (produziert *Wnt*-Gene), der Chorda dorsalis-Bodenplatten-Komplex (prod. *Shh*-Gene) und das dorsale Ektoderm (prod. *Wnt*-Gene). Eine perfekte Balance dieser Faktoren ist wichtig, damit die Myogenese fortschreiten kann (Munsterberg et al., 1995; Munsterberg and Lassar 1995).

In Stadium **HH 17** sieht man die Somiten der *Myf5*-Serie wie folgt. Die Somiten I und II exprimieren kein *Myf5*. Somit III zeigt am ventromedialen Rand des Dermomyotoms eine schwache Expression. Die folgenden Somiten sind alle gefärbt, wobei die Intensität der Expression mit dem Alter der Somiten zunimmt. Die Ergebnisse der In situ-Hybridisierung mit *MyoD* variieren: Erst bei Somit IV kann eine zarte Expression beobachtet werden. Die Somiten I bis III sind frei von *MyoD*-exprimierenden Zellen. Ab Somit V erscheint eine deutliche Expression.



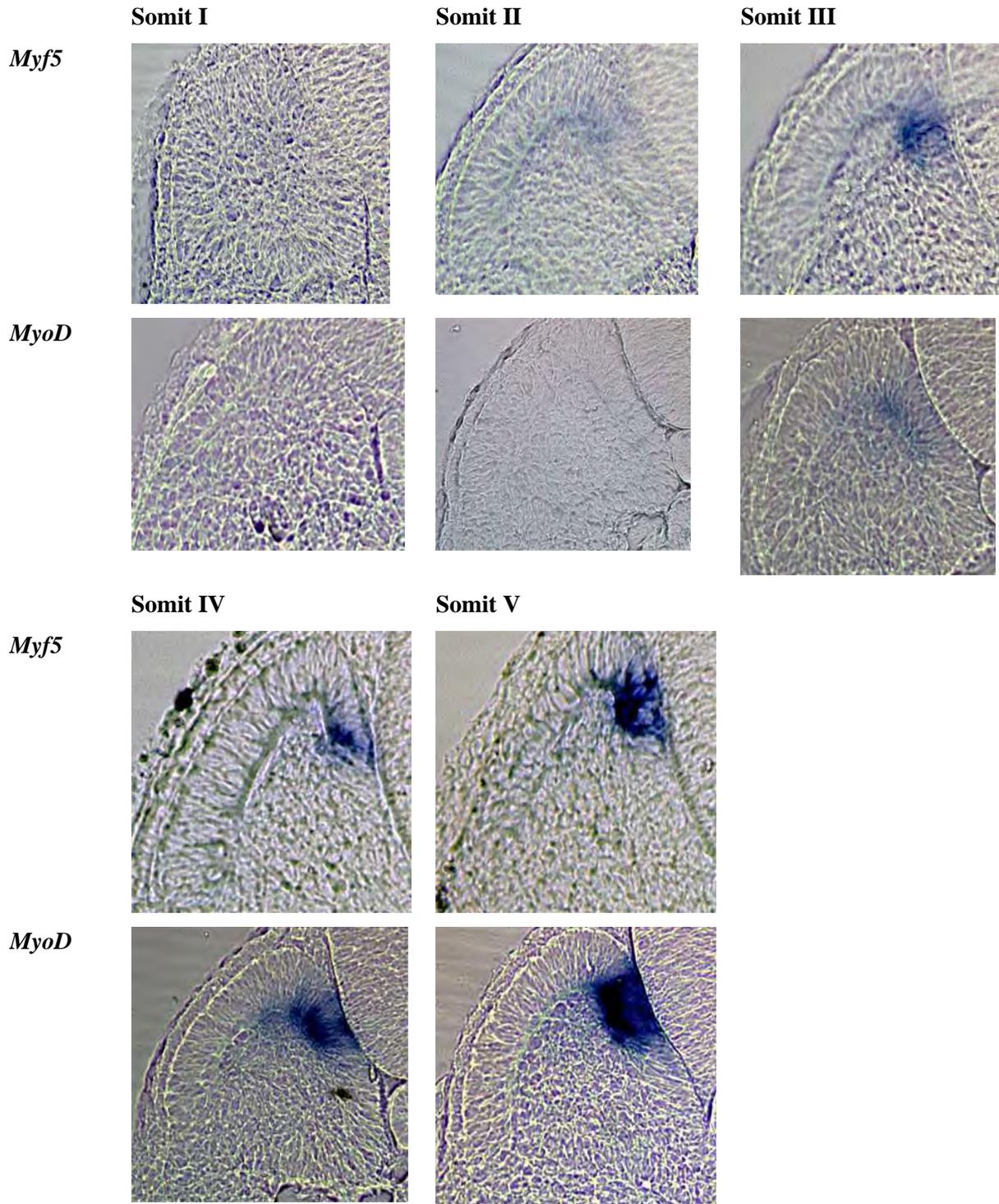
Dar. 12: Vibratom-Schnitte HH 17, Somit I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

In Stadium **HH 18** stellt sich das Muster der *Myf5*-exprimierenden Zellen bei den einzelnen Somitenstadien folgendermaßen dar: Die Somiten I und II sind ungefärbt. Erst Somit III exprimiert ventromedial des Dermomyotoms ein schwaches Signal. Die Expression bei den Somiten IV und V ist hingegen stark ausgeprägt. In der *MyoD*-Serie gibt es keine Unterschiede: Auch hier ist die Expression bei Somit IV ebenso stark wie bei Somit V. Die jüngeren Somiten zeigen die Expression schwächer (S III) bzw. nicht (SI und SII).



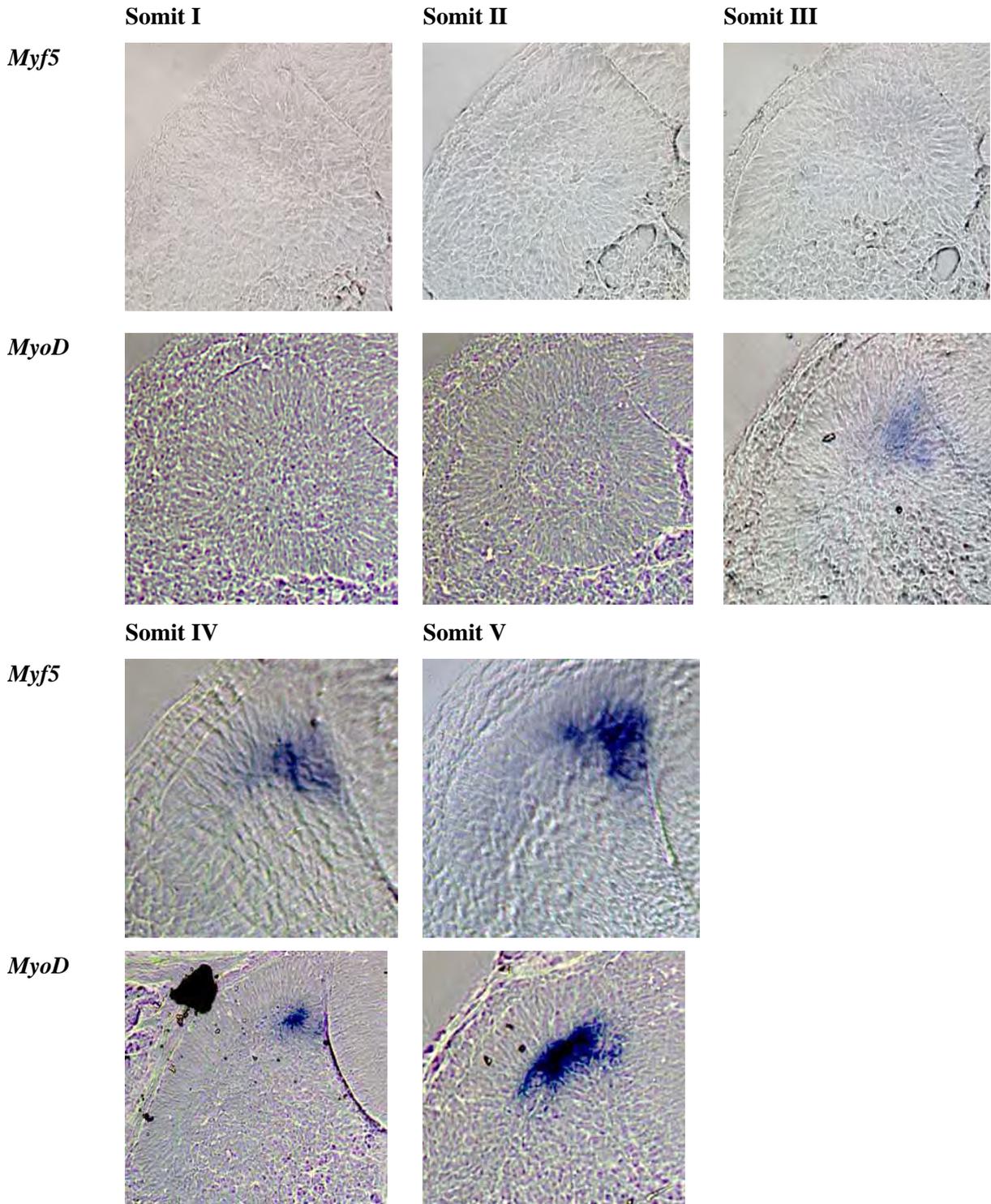
Dar. 13: Vibratom-Schnitte HH 18, Somit I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

In Stadium **HH 19** ist Somat I der *Myf5*-Serie ungefärbt. Ab Somat II ist eine Expression zu beobachten, die mit zunehmendem Alter der Somaten auch in ihrer Intensität zunimmt. Die jüngeren Somaten I und II der *MyoD*- Reihe zeigen noch keine Expression. Somat III weist eine *MyoD*-Expression im dorsomedialen Bereich des Myotoms auf. Diese verstärkt sich bei den Somaten IV und V.



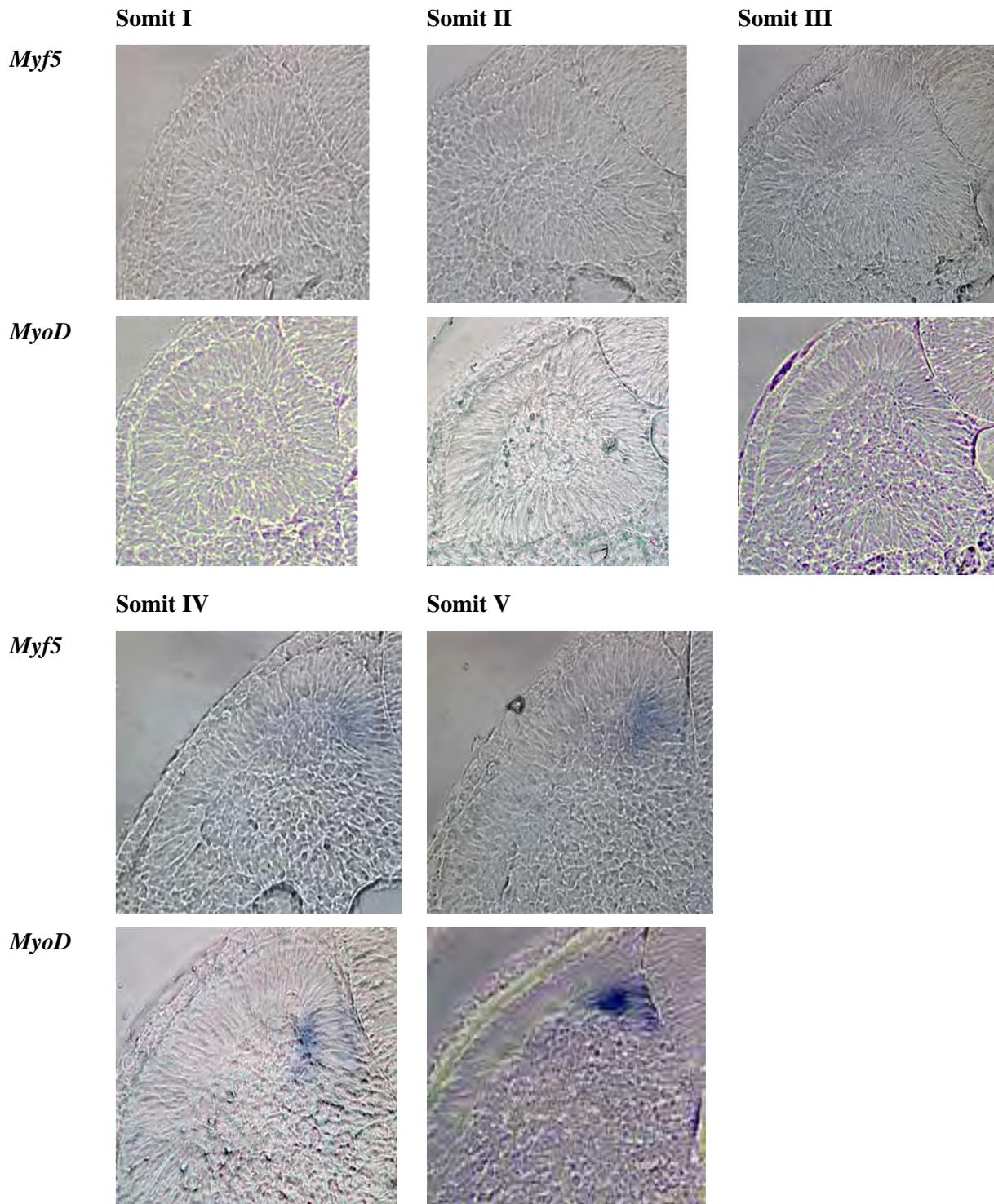
Dar. 14: Vibratom-Schnitte HH 19, Somat I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

In **Stadium HH 20** zeigen die jüngsten drei Somiten noch keine *Myf5*-exprimierenden Zellen auf. Erst Somit IV exprimiert *Myf5* im dorsomedialen Myotoms. Die Bilder der *MyoD*-Schnitte zeigen, dass die Somiten I und II kein *MyoD* exprimieren. Erst Somit III und die älteren Somiten sind deutlich gekennzeichnet. Die Intensität der Expression nimmt auch hier stetig nach kranial zu.



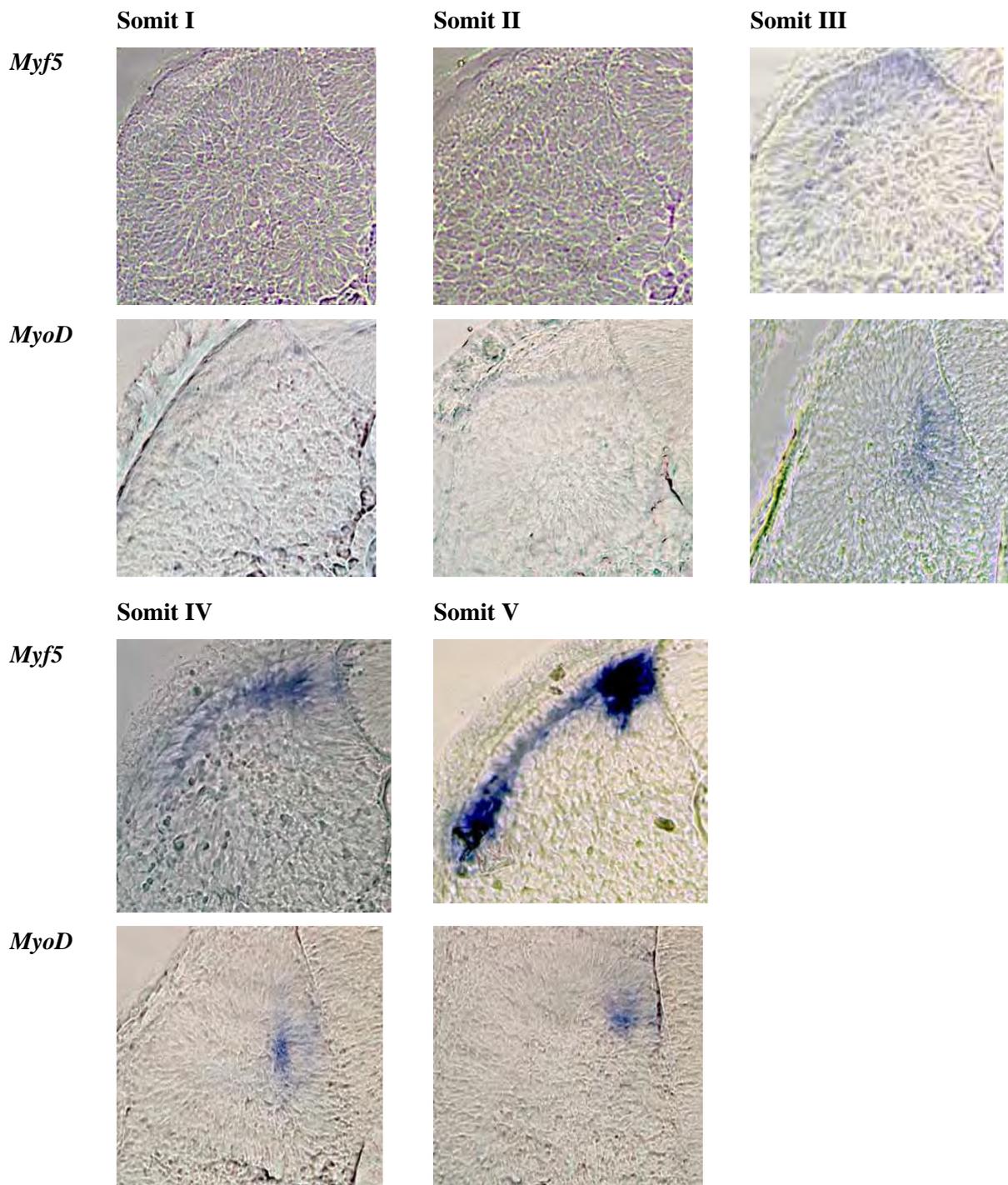
Dar. 15: Vibratom-Schnitte HH 20, Somit I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

HH 21: Die Resultate der Myotom-Darstellung sind in den beiden In situ-Hybridisierungen mit *MyoD* und *Myf5* im Stadium HH 21 identisch: Somite I, II und III weisen keine Expressionen auf. Die Somiten IV und V zeigen deutliche *MyoD*- und *Myf5*-Expressionen.



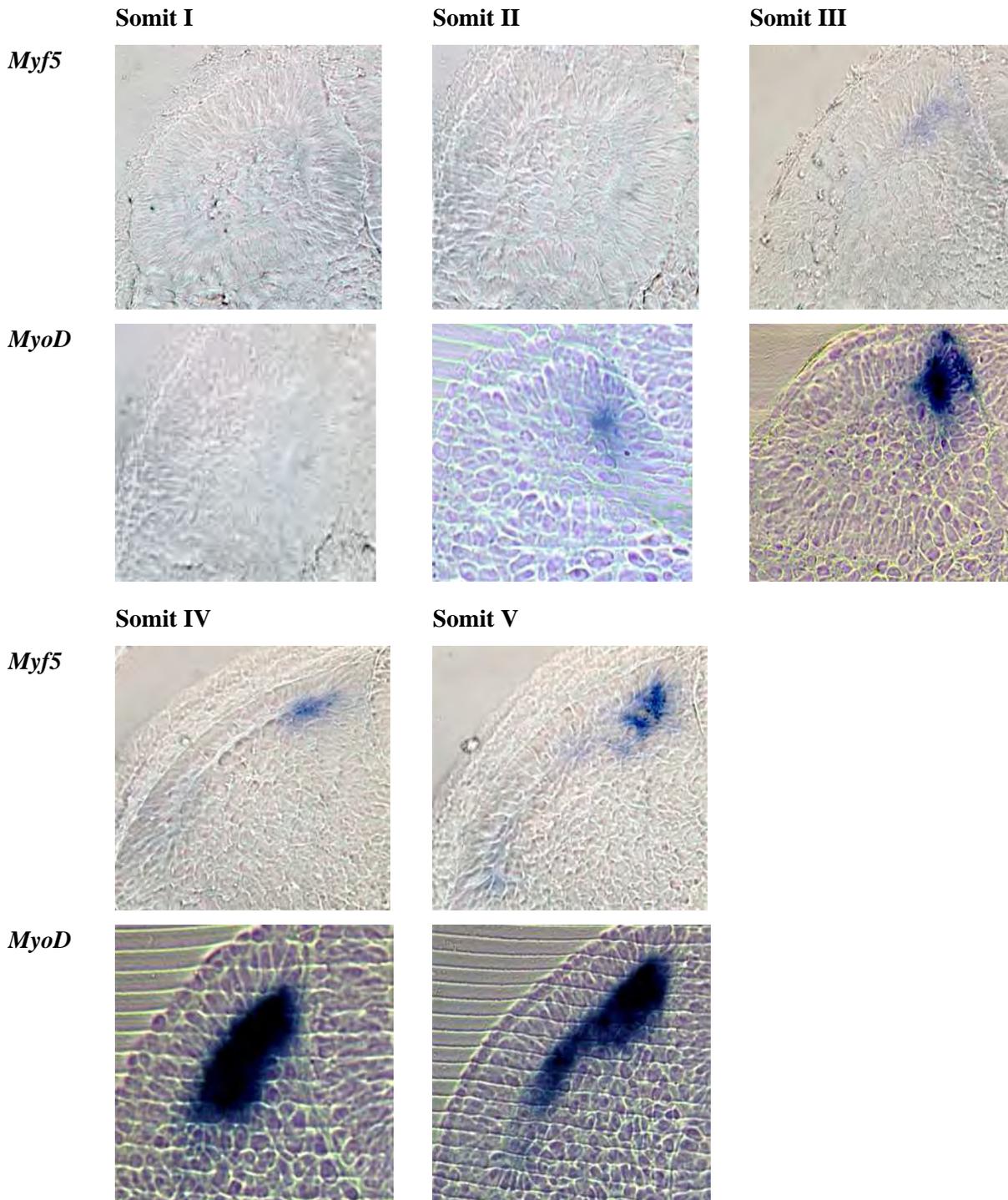
Dar. 16: Vibratom-Schnitte HH 21, Somite I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

HH 22: Hier zeigen die Somiten I und II noch keine Genexpressionen im Myotom. Bei Somite III exprimieren die Myotomzellen *Myf5* und *MyoD* noch schwach. Ab dem vierten kaudalen Somiten (S IV) stellt sich die Expression dann deutlich dar.



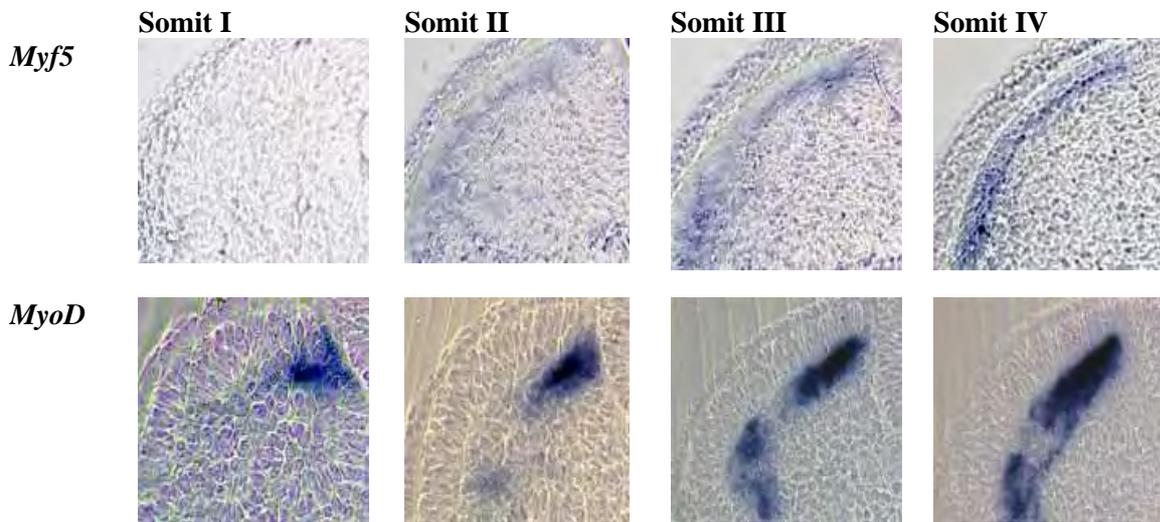
Dar. 17: Vibratom-Schnitte HH 22, Somit I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

In Stadium **HH 23** ist bei den Somiten I und II der hybridisierten Embryos keine *Myf5*-Expression vorhanden. Bei Somite III ist die Expression schwach. Die folgenden älteren Somiten (IV, V etc.) hingegen weisen eine starke Expression auf. Die Somiten der *MyoD*-Reihe zeigen die Expression der myotomalen Zellen schon ab Somite II.



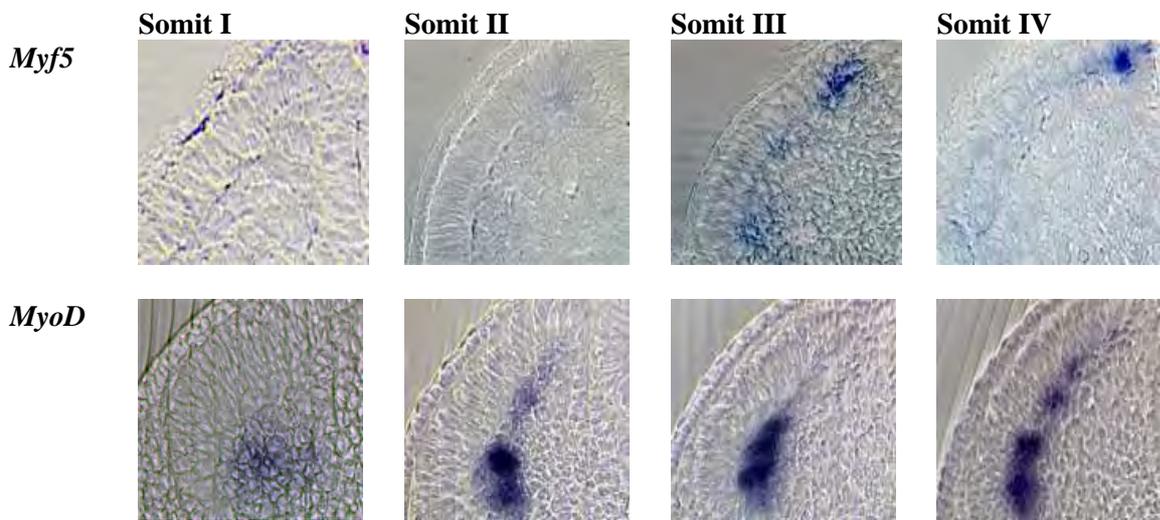
Dar. 18: Vibratom-Schnitte HH 23, Somit I bis V, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

HH 24: Somit I der *Myf5*-Serie stellt sich in Stadium HH 24 noch ohne Genexpression dar. Somit II und die folgenden älteren exprimieren *Myf5*. Bei den Somitenstadien der *MyoD*-Reihe liegt die Genexpression schon ab Somit I vor.



Dar. 19: Vibratom-Schnitte HH 24, Somit I bis IV, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

HH 25: Die Somitenstadien der *Myf5*-Schnittserie gleichen im Stadium HH 25 denen aus HH 24. Hier sind die Somiten ab Somitenstadium II markiert, wobei die erste Expression noch schwach erscheint. Die Somiten der *MyoD*-Reihe zeigen ab Somit I die Genexpression.

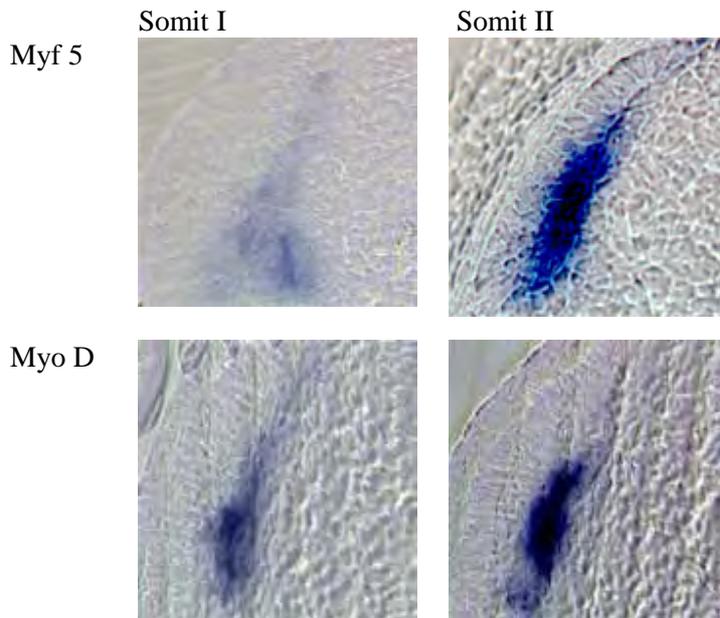


Dar. 20: Vibratom-Schnitte HH 25, Somit I bis IV, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

HH 26, HH 27 und HH 28:

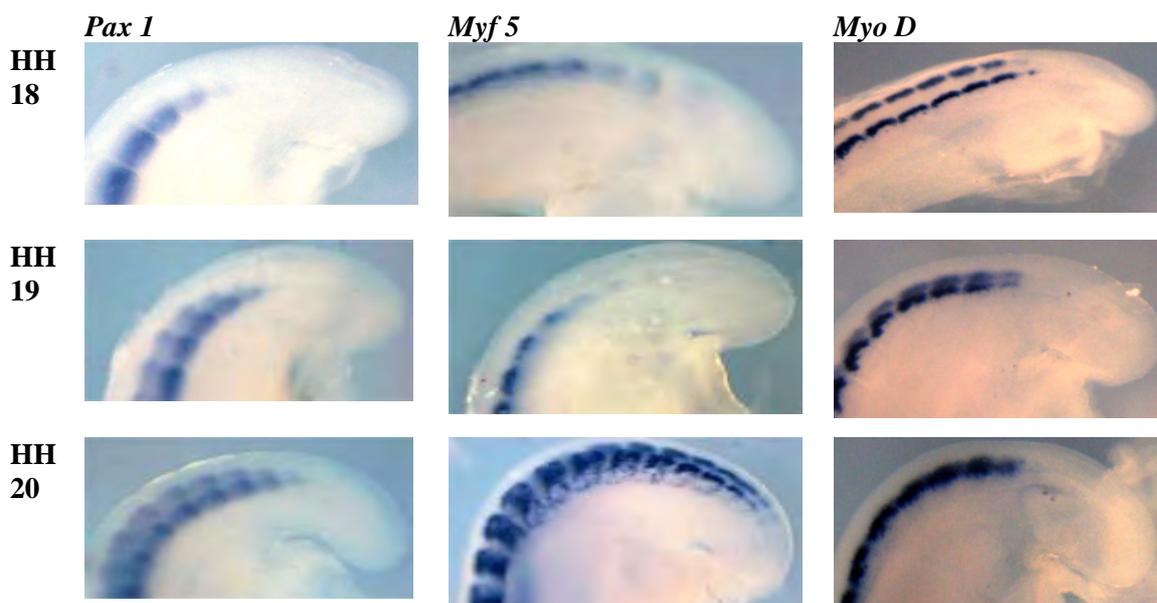
In den drei ältesten untersuchten Stadien treten keine Unterschiede zwischen der *Myf5*- und der *MyoD*-Serie auf. Bei den jüngsten Somiten S I liegen die Genexpressionen schon deutlich vor. Die Genexpressionen bei den folgenden älteren Somiten weisen ebenfalls eine starke Intensität auf und dehnen sich ventral des gesamten Dermomyotoms aus.

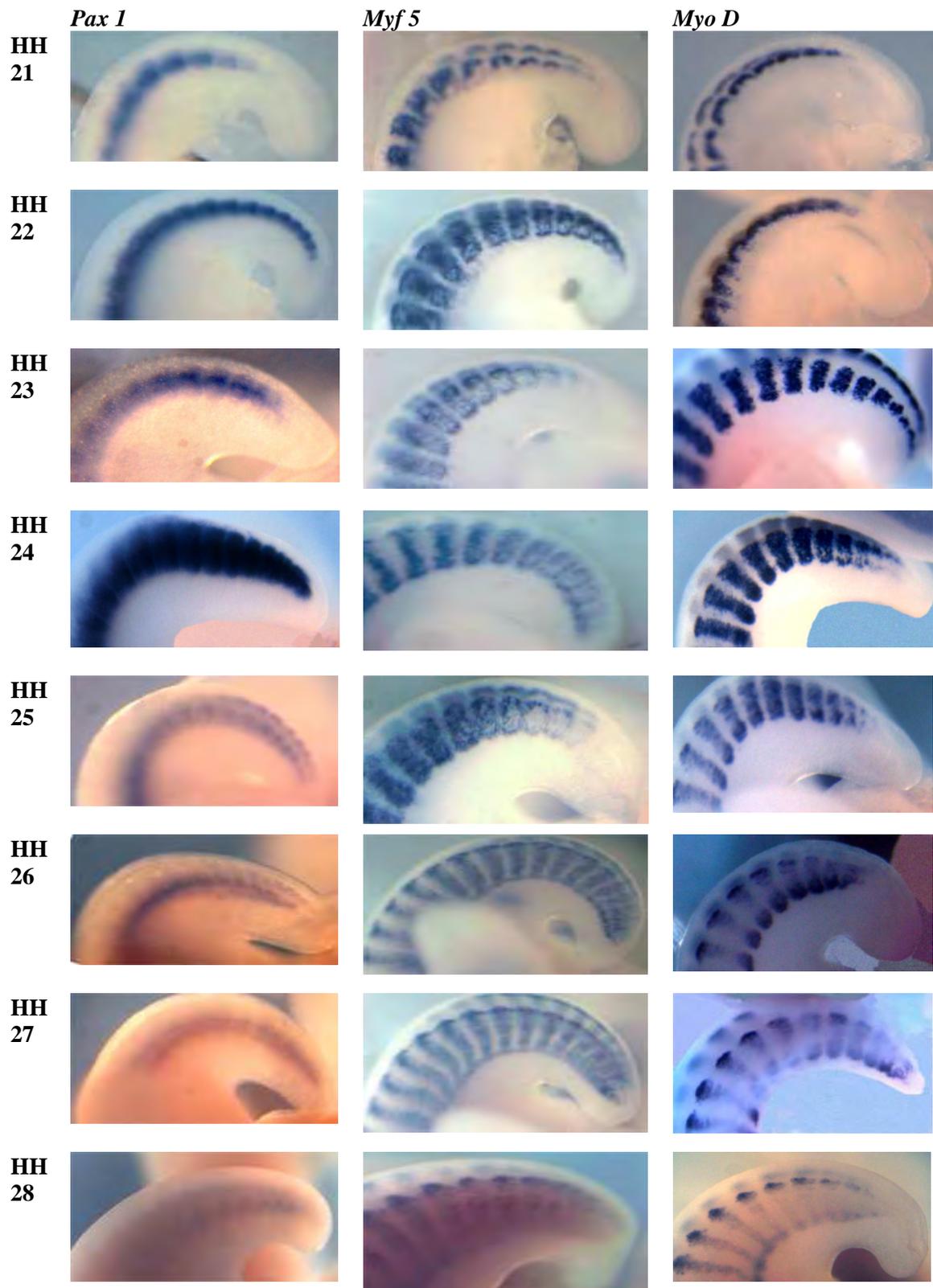
HH 26:



Dar. 21: Vibratom-Schnitte HH 26, Somit I und II, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 40fach

3.2.4 Bilder der Wholemounts





Dar. 22: Wholemounds HH 18 bis HH 28, Tailbud, *Pax 1*-, *MyoD*- und *Myf5*-Darstellung, Lichtmikroskop Vergrößerung 10fach

3.2.5 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
HH 17	Somit			V	IV	III	II	I													
	semi			○	○	○	○	○													
	<i>pax 1</i>			X	X																
	<i>myo D</i>			X	X																
	<i>myf 5</i>			X	X																
HH 18	Somit					IV	III	II	I												
	semi					○	○	○	○												
	<i>pax 1</i>					X	X														
	<i>myo D</i>					X	X														
	<i>myf 5</i>					X	X														
HH 19	Somit										V	IV	III	II	I						
	semi										○	○	○	○	○						
	<i>pax 1</i>										X	X	X								
	<i>myo D</i>										X	X	X								
	<i>myf 5</i>										X	X	X								
HH 20	Somit														V	IV	III	II	I		
	semi														○	○	○	○	○		
	<i>pax 1</i>														X	X	X				
	<i>myo D</i>														X	X	X				
	<i>myf 5</i>														X	X	X				

Legende
 ○ kompartimentierter Somit
 ○ epithelialer Somit, bzw. Übergang von epithelial zu mesenchymal
 X Genexpression
 x schwache Genexpression

	Somiten	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
HH 21		V	IV	III	II	I								
	semi	O	O	O	O	O								
	<i>pax 1</i>	X	X	X										
	<i>myo D</i>	X	X											
	<i>myf 5</i>	X	X											
HH 22							V	IV	III	II	I			
	semi						O	O	O	O	O	O		
	<i>pax 1</i>						X	X	X	X	X			
	<i>myo D</i>						X	X	X					
	<i>myf 5</i>						X	X	X					
HH 23												III	II	I
	semi											O	O	O
	<i>pax 1</i>											X	X	X
	<i>myo D</i>											X	X	
	<i>myf 5</i>											X		
HH 24												III	II	I
	semi											O	O	O
	<i>pax 1</i>											X	X	X
	<i>myo D</i>											X	X	X
	<i>myf 5</i>											X	X	X

HH 25										I	II	III	IV	V
	semi									O	O	O	O	O
	<i>pax 1</i>									X	X	X	X	X
	<i>myoD</i>									X	X	X	X	X
	<i>myf 5</i>									X	X	X	X	X
HH 26										V	IV	III	II	I
	semi									O	O	O	O	O
	<i>pax 1</i>									X	X	X	X	X
	<i>myo D</i>									X	X	X	X	X
	<i>myf 5</i>									X	X	X	X	X
HH 27										V	IV	III	II	I
	semi									O	O	O	O	O
	<i>pax 1</i>									X	X	X	X	X
	<i>myo D</i>									X	X	X	X	X
	<i>myf 5</i>									X	X	X	X	X

Dar. 23: Tabellarische Übersicht Somitenstadien, HH 17 bis HH 27, Semidünnschnitte, *Pax1*-, *MyoD*-, *Myf5*-Darstellung

3.3 Immunhistochemische Färbung mit MF 20

Eine weitere Möglichkeit das zeitliche Erscheinen des Kompartiments „Myotom“ darzustellen, ist die Anfärbung des Muskelproteins Myosin Heavy chain „MF 20“. Das Experiment (Immunhistochemie) wurde am Wholemout durchgeführt und beurteilt.

Ungefärbtes Somitenmaterial ist im Wholemout nicht sicher identifizierbar und kann zahlenmäßig nicht in Somitenpaaren erfasst werden. Die Anzahl ungefärbter Somiten wird deshalb rechnerisch anhand der maximalen Somitenzahl, die pro Stadium datiert ist, ermittelt.

3.3.1 Ergebnisse der Immunhistochemie mit MF 20

In Stadium HH 17 sind die Muskelproteine MF 20 der Somiten 1 bis 15 (von kranial nach kaudal gezählt) farblich kenntlich gemacht. Die Somiten 13 bis 15 sind deutlich schwächer gefärbt als die vorherigen. Die folgenden jüngeren Somiten 16 bis 29 (bzw. 32) sind farblos.

Im nächsten Stadium (HH 18) zeigen sich die Somiten 1 bis 12 stark gefärbt, wohingegen die Somiten 13 bis 18 eine schwächere Färbung aufweisen. Die Somiten 19 bis 30 /36 sind ungefärbt.

In Stadium HH 19 sind 21 Somitenpaare gefärbt. Insgesamt weisen die Embryonen in diesem Stadium eine Gesamtsumitenzahl von 37 bis maximal 40 auf. Infolgedessen sind je nach Präparat 16 bis 19 Somiten noch ungefärbt.

In Stadium HH 20 sind die Somiten 1 bis 22 deutlich gefärbt. Die folgenden jüngeren Somiten 23 bis 40 (bzw. 43) sind noch ungefärbt.

HH 21: 23 Somiten sind in Stadium HH 21 gefärbt. Bei einer Gesamtsumitenzahl von 43 (bzw. 44) liegt die Menge an noch ungefärbten Somitenpaaren bei 20 (bzw. 21).

HH 22: Im 22sten Entwicklungsstadium sind die ersten 36 Somiten gefärbt. Dieses Stadium enthält bereits 48 Somiten. Infolgedessen ist die Anzahl an ungefärbten Somiten 12.

In Stadium HH 23 sind 38 Somiten gefärbt. Die vier jüngsten von diesen weisen eine schwächere Färbung auf. Die ungefärbte Somitenanzahl liegt bei 11 Somitenpaaren. Ab diesem Stadium ist die Somitogenese abgeschlossen.

HH 24: 41 von den insgesamt 49 (bis 52) Somitenpaaren sind im 24sten Stadium gefärbt. Die jüngeren 8 (bis 12) Somiten sind noch farblos und enthalten folglich noch keinen Muskelfaseranteil.

In Stadium HH 25 liegen schon 44 Somiten in gefärbtem Zustand vor. Lediglich 5 (bzw. maximal 8) Somitenpaare sind noch nicht farblich darstellbar.

3.3.2 Tabelle der MF20-Abbildungen

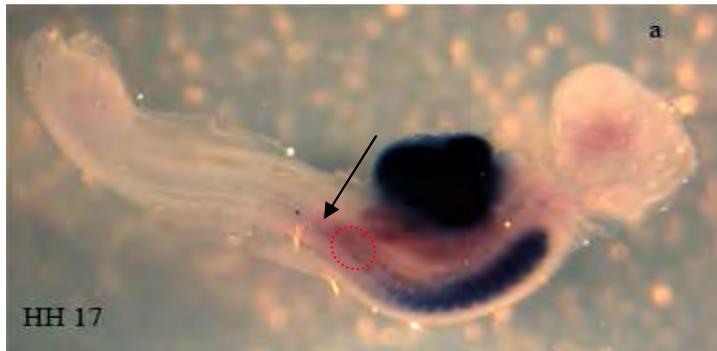


Abb. a:
HH 17, MF 20:
 S 1 - 13 stark positiv,
 S 14 - 15 schwach pos. (rote Markierung),
 S 16 (Pfeil) - 29 negativ



Abb. b:
HH 18, MF 20:
 S 1 - 12 stark pos.,
 S 13 - 18 schwach pos. (rote Markierung),
 S 19 (Pfeil) - 30 neg.



Abb c:
HH 19, MF 20:
 S 1 - 21 positiv,
 S 22 (Pfeil) - 37 negativ



Abb. e:
HH 21, MF 20:
 S 1 - 23 positiv,
 S 24 (Pfeil) - 43 negativ

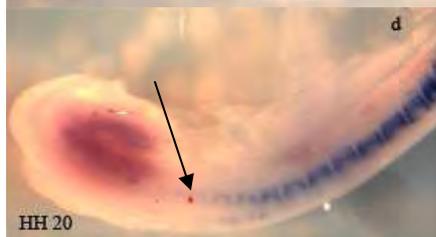


Abb. d: HH 20
 S 1 - 22 positiv,
 S 23 (Pfeil) - 40 negativ

Abb. f: HH 22
 S 1 - 36 positiv,
 S 37 (Pfeil) - 49 negativ

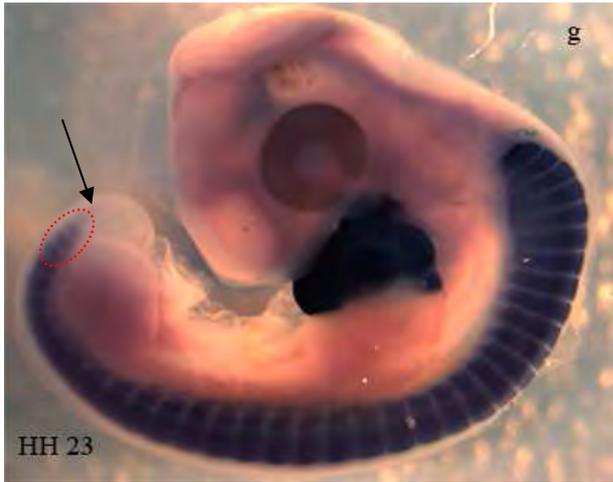


Abb. g:
 HH 23, MF 20:
 S 1 - 34 stark
 positiv,
 S 35 - 38 schwach
 positive (rote
 Markierung),
 S 39 (Pfeil) - 49
 negativ



Abb. h:
 HH 24, MF 20:
 S 1 - 41 positiv,
 S 42 (Pfeil) - 49
 negativ

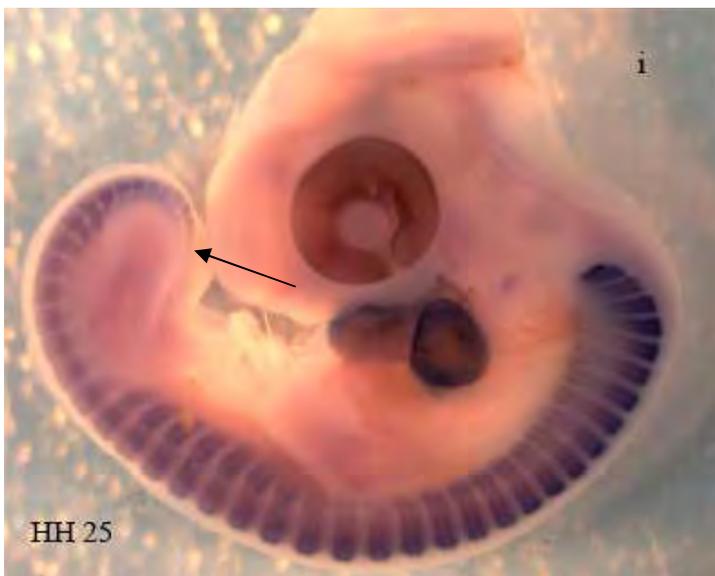


Abb. i:
 HH 25, MF 20:
 S 1 - 44 positiv,
 S 45 (Pfeil) - 49
 negativ

Dar. 24: Wholemount-Abbildungen MF 20, HH 17 bis HH 25, Lichtmikroskop Vergrößerung 10fach

4 Diskussion

4.1 Vergleich zwischen den Ergebnissen der Semidünnschnitte und der mit Sonden markierten Schnitten

Die Kompartimentierung der Somiten ist morphologisch darstellbar: Der epithelio-mesenchymale Übergang beginnt mit der Auflösung des Epithels im ventrolateralen Bereich. Der Prozess der Auflösung schreitet dann sowohl nach medial als auch nach dorsal voran. Gleichzeitig lockert sich die Dichte der Somitozölzellen. Das Skerotom wird gebildet. Der kompartimentierte Zustand des Somiten besteht aus dem Sklerotom und dem Dermomyotom. Letzteres entwickelt sich weiter zu Dermatome und Myotome. Die einzelnen Entwicklungsschritte nehmen jeweils einen bestimmten Zeitraum in Anspruch. Deswegen ist es schwierig, eine eindeutige Aussage zu treffen, ab welchem Somiten der mesenchymale Status endgültig erreicht ist.

Neben der morphologischen Darstellung im Semidünnschnitt können als weitere Anhaltspunkte zur Beurteilung des epithelio-mesenchymalen Überganges die molekularen Marker des Sklerotoms und Myotoms herangezogen werden. Die Somitenzellen tragen Information über die einsetzende Differenzierung in genetischer Form. Diese wird durch Sonden nachgewiesen und optisch kenntlich gemacht. *Pax1* zeigt die einsetzende Mesenchymalisierung an, die Sonden *MyoD* und *Myf5* die einsetzende Muskeldifferenzierung. Die Mesenchymalisierung auf genetischer Ebene ist Voraussetzung für die Bildung des Sklerotoms bzw. der Umstrukturierung vom epithelialen zum kompartimentierten Somiten. Daher ist die Darstellung der Pax1-Expression zeitlich kurz vor der morphologischen Kompartimentierung erkennbar.

Es stellt sich die Frage, ob der epithelio-mesenchymale Übergang jeweils im gleichen Somitenstadium (z.B. bei Somite III) pro embryonalem Stadium erscheint. Die Somiten der Embryonalstadien nach Hamburger und Hamilton werden in morphologischer und genetischer Sicht miteinander verglichen.

Die Somiten I und II sind bei Stadium HH 17 noch epithelial (s. Ergebnisse). Bei Somite III erscheinen die Expressionen von *Pax1* und *Myf5*; die Expression von *MyoD* besteht ab Somite IV. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei Somite III um ein Übergangs-Stadium handelt, da zum einen die *Pax1*-Expression in schwacher Intensität erscheint, was bedeutet, dass nur wenige Zellen *Pax1* exprimieren. Zum anderen stellt sich dieser Somite im sagittalen Semidünnschnitt noch kugelförmig dar. Der transversale Schnitt zeigt eine großzügige Auflösung des Epithels im ventrolateralen Bereich. Die Entwicklung des epithelialen Somiten

zum kompartimentierten Status dauert über ein Somitenstadium an, welches ca. 90 Minuten in Anspruch nimmt.

In Stadium HH 18 sind die Ergebnisse ähnlich. Sowohl die morphologische Veränderung als auch das Auftreten von Farbreaktionen der In situ-Hybridisierung sind ab dem Somiten III erkennbar. Die jüngeren Somiten I und II sind epithelial und ohne Expression der Gene *Pax1*, *MyoD* und *Myf5*. Die Expressionen von Somit III sind noch schwach, ab Somit IV aber deutlich.

In Stadium HH 19 erscheint die *Pax1*-Expression ab dem dritten kaudalen Somiten (S III) und somit zeitgleich wie die morphologische Darstellung der Kompartimente. Die Intensität der Expression ist noch schwach. Morphologisch stellt sich dieser Somit als Übergangsstadium dar. Erst Somit IV ist deutlich kompartimentiert. *Myf5* hingegen ist wieder früher ab dem Somiten II zu erkennen.

In Stadium HH 20 sind die Somiten I und II epithelial und auch frei von *Pax1*-, *MyoD*- und *Myf5*-exprimierenden Zellen. Deutliche Prozesse der Somitenentwicklung treten erst ab dem Somiten III auf. Dieser befindet sich im Übergangsstadium. Bei der Serie an *MyoD*- und *Pax1*-hybridisierten Embryonen stellt sich die epithelio-mesenchymale Umformung ab dem Somiten III dar. Dieser zeigt einen positiven Gennachweis. Die Expression von *Myf5* ist erst ab Somit IV erkennbar.

Im nächsten Stadium HH 21 treten die Merkmale des Myotoms (*MyoD* und *Myf5*) verglichen zur Morphologie und Sklerotomanfärbung zeitlich verzögert auf. Somit IV der *MyoD*- und *Myf5*-Serien weist eine Expression auf, während *Pax1* schon bei Somit III dargestellt ist. Die morphologische Kompartimentierung ist auch ab Somit III erkennbar.

In Stadium HH 22 zeigt sich im Semidünn-Schnitt die Kompartimentierung ab Somit III, welcher sich gerade im Übergang von epithelial zu mesenchymal befindet. Somit IV ist kompartimentiert. *Pax1* hingegen wird schon ab dem Somiten II (also früher) exprimiert. Die Schnitte der *MyoD*-Serie zeigen eine schwache Expression bei Somit III und eine stärkere bei Somit IV. Ebenso stellt sich die Expression von *Myf5* dar.

Stadium HH 23 ist morphologisch ab dem Somiten IV kompartimentiert. Der Nachweis von *Myf5*-exprimierenden Zellen gelingt ab dem Somiten III in schwacher, ab dem Somiten IV in starker Form. Die Serien der mit *Pax1* und *MyoD* hybridisierten Embryonen verlaufen in ihrer Entwicklung schneller. Nur noch Somit I ist frei von *MyoD*-exprimierenden Zellen. *Pax1* erscheint schon bei Somit I.

Im nächsten Stadium HH 24 befindet sich Somit II der Semidünn-Schnitt-Serie im epithelio-mesenchymalen Übergang. Somit III ist kompartimentiert. Die Expressionen von *Pax1* und

MyoD sind ab dem ersten Somiten dargestellt. Die *Myf5*-Serie zeigt die Expression ab Somiten II.

Ab dem Stadium HH 25 sind alle Somiten des Hühnerembryos morphologisch kompartimentiert. Auch die Darstellung der Genexpressionen ist in allen untersuchten Fällen (*Pax1*, *MyoD*, *Myf5*) positiv.

Die Ergebnisse der Semidünn-Schnitte (Morphologie) und der In situ-Hybridisierung (*Pax1*, *Myf5*, *MyoD*) sind bei den embryonalen Entwicklungsstadien nicht immer identisch. Es treten geringe Schwankungen und Unterschiede auf. Tendenziell handelt es sich um einen einheitlich fortlaufenden Prozess. Der entscheidende Wechsel zwischen epithelialen und mesenchymalen Zustand der Somiten liegt meist zwischen dem Somiten II und III bzw. III und IV. Lediglich ab den späteren Stadien verschiebt sich der Umbruch zwischen die Somiten I und II. Ab dem Stadium HH 25 sind alle Somiten kompartimentiert und der Prozess der Mesenchymalisierung ist abgeschlossen. Auffällig ist, dass die myotomalen Marker meist zeitgleich mit dem sklerotomalen Marker *Pax1* erscheinen. Das bedeutet, dass die genetische Entwicklung entweder tatsächlich zeitgleich gebildet wird oder dass die zeitliche Differenz so gering ist, dass sie die Zeitspanne von einem Stadium nach Hamburger und Hamilton (etwa 6 Stunden) nicht übersteigt. Das Myotom selbst kompartimentiert sich dagegen erst wesentlich später (Somitenstadium V bis VII). Zu Beginn der Entwicklung der Myotoms liegen nur im dorsomedialen Bereich wenige Zellen mesenchymalen Charakters vor, die *MyoD* und *Myf5* exprimieren.

4.2 Dynamik der Somitenentwicklung anhand der Schnittserien

4.2.1 Pax1 und seine Entwicklung

Die Entwicklung der Schnittserie mit *Pax1*-behandelten Embryonen stellt sich wie folgt dar: Vom Stadium HH 17 bis zu HH 21 sind die Färbungen der *Pax1*-exprimierenden Zellen ab dem Somiten S III zu erkennen. Während es sich bei den Stadien HH 17, 19 und 20 um ein schwaches Expressionsmuster handelt, tritt dieses bei Somiten III des Stadiums HH 18 schon deutlich auf. In Stadium HH 22 erscheint die Darstellung der *Pax1*-exprimierenden Zellen schon ab Somiten II. Anschließend wandert die Grenze des Übergangs zwischen epithelialen und kompartimentierten Somiten weiter nach kaudal und erscheint bei den folgenden Stadien HH 23 und 24 bereits ab dem Somiten I. Hier stellt sich die Expression zunächst noch schwach dar. Ab dem Stadium HH 25 zeigen alle Somiten - einschließlich Somiten I - eine deutliche *Pax1*-Expression. Betrachtet man das *Pax1*-Expressionsmuster vor dem Hintergrund

der Anzahl an neugebildeten Somiten, fällt zunächst eine einheitliche Entwicklung auf: Die Anzahl neugebildeter Somiten beträgt in den Stadien HH 17 bis 20 drei bis vier. Da in jedem dieser Stadien die *Pax1*-Expression auf die Somiten S III bzw. S IV fällt, ist die Geschwindigkeit der Entwicklung hier konstant.

Die Entwicklung der Somiten ist zwischen dem Stadium HH 20 und 21 in seiner Geschwindigkeit leicht verzögert. Auch hier besteht wie bei den vorangegangenen Stadien eine zeitliche Differenz von ca. 4½ Stunden. Es werden aber weniger Somiten (1 bis max. 3) gebildet. Da auch in Stadium HH 21 die *Pax1*-Expression auf den Somiten S III fällt, bedeutet das, dass die Entwicklung der zuvor abgeschnürten Somiten langsamer abläuft. Anschließend nimmt die Entwicklungsgeschwindigkeit zu: sowohl in Stadium HH 22 als auch HH 23 sind mehr Somiten angefärbt (ab Somit S II bzw. S I) als in den vorherigen Stadien, während aber gleich viele Somiten neugebildet werden. Dies spricht für eine schnellere Entwicklung vom epithelialen zum kompartimentierten Zustand. Die Neubildung von Somiten im Hühnerembryo ist ab dem Stadium HH 23 abgeschlossen. Ab hier werden die vorhandenen Somiten weiterentwickelt, aber keine neuen von der Segmentplatte abgeschnürt. Die genetische Entwicklung schreitet also weiter voran, was an der Intensität der *Pax1*-Expression deutlich gezeigt wird. In Stadium HH 25 sind die *Pax1*-exprimierenden Zellen bei Somit I zahlreich vorhanden.

4.2.2 Vergleich der myotomalen Markern

Die Ergebnisse der *MyoD*- und *Myf5*-Schnittserien sind nicht identisch. Beide sind zwar genetische Marker für das Kompartiment „Myotom“, stellen sich aber nicht immer im gleichen Somitenstadium dar. Nach früheren Erkenntnissen (Scaal and Christ 2004) erscheint die Expression von *MyoD* im Hühnerembryo früher als die der *Myf5*-behandelten Embryonen. Die Untersuchungen der kaudalen Somiten der Stadien HH 18, 20 und 22 zeigen, dass die *MyoD*-Expression zeitgleich auftritt. Früher erscheint sie in den Stadien HH 23 und 24. Die *Myf5* Genexpression ist wiederum in den Stadien HH 17 und 19 früher präsent.

4.2.3 Dynamik der Somitogenese

Der Entwicklung der Somiten schreitet zeitlich in den unterschiedlichen Stadien nicht vollkommen linear voran. Es ist bekannt, dass im Hühnerembryo ab dem 12-Somitenstadium (HH 11) alle 90 Minuten ein Somit gebildet wird (Menkes and Jervis 1961). Vorher verbleiben die Zellen ca. 15 bis 18 Stunden in der Segmentplatte. Die Stadieneinteilung von Hamburger und Hamilton bezieht sich nicht auf Somitenanzahlen. Folglich bilden sich

teilweise unterschiedlich viele Somiten pro Stadium (HH 17: max. 3 Somiten, HH 18: ca. 4 Somiten, HH 19: ca. 4 Somiten). Ab dem Stadium HH 22 sind die Neubildung der Somiten und der Abschluss der kraniokaudalen Segmentierung in den bisherigen Untersuchungen nicht bekannt. Nach Menkes und Jervis (1961) müsste die Somitenneubildung im Stadium HH 23 abgeschlossen sein. Zu diesem Zeitpunkt sind 49 bzw. 52 Somiten vorhanden (maximale Somitenzahl). Diese Annahme stimmt mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit überein.

Betrachtet man den zeitlichen Aspekt der Somitenreifung, fällt eine Besonderheit bei den zwei jüngsten Somiten (SI und II) in Stadium HH 24 und 25 auf: im Stadium HH 23 sind drei epitheliale Somiten vorhanden. Da sich keine neuen Somiten mehr von der Segmentplatte abschnüren, handelt es sich um die gleichen Somiten, welche auch in den Stadien HH 24 und 25 am kaudalen Ende liegen. Zwischen den Stadien HH 23, 24 und 25 liegen zeitliche Differenzen von zwölf und sechs Stunden. In jüngeren Stadien bilden sich während der Somitogenese in sechs Stunden vier neue Somiten. Ab Stadium HH 23 hingegen braucht die Entwicklung eines Somiten wesentlich länger (ca. 6 Stunden), da im Stadium HH 24 noch zwei Somiten im epithelialen Zustand vorliegen; in Stadium HH 25 existiert kein epithelialer Somit. Anhand der temporalen Gesetzmäßigkeiten - alle 90 Minuten reift jeweils ein Somit zu seinen Kompartimenten heran - stellt sich also die Frage, warum die Entwicklung der Somiten I und II in Stadium HH 25 langsamer verläuft. Im vorherigen Stadium ist Somit I epithelial und nun ist der gleiche Somit nur wenig weiter entwickelt. Er stellt sich fast noch geschlossen epithelial dar. Lediglich ventral ist eine Unterbrechung des Epithels zu sehen. Verläuft die Entwicklung ab HH 25 verzögert ab? Oder liegt die Morphologie nur einer optischen Täuschung auf und stellt sich hier besonders dar? Im Stadium HH 25 erfährt das äußerst-kaudale Ende der Segmentplatte eine erneute Krümmung nach ventral. Hierdurch könnte die äußere Form des Somiten abgeplattet erscheinen. Die Dermomyotomlippen, die weit nach ventral reichen, könnten sich auch gering nach innen wölben und einen noch relativ undifferenzierten Somiten vortäuschen. Zieht man die Ergebnisse der Gen-markierten Zellen hinzu, erhärtet sich diese Annahme, da dieser Somit in allen drei untersuchten Markern positiv erscheint. Trotz der Annahme der optischen Täuschung kann aber auf jeden Fall von einer Verlangsamung in der Differenzierung ausgegangen werden, da es sich insgesamt um einen Zeitraum von 18 Stunden handelt (HH 23 bis 25), in denen eine schnellere Veränderungen erwartet wird.

4.3 Entwicklungsunterschiede in den kranialen und kaudalen Bereichen des Embryos

Anhand des Hühnerembryos wurde schon viel über die Somitogenese und Somitenkompartimentierung erforscht. Meist bezogen sich die Schwerpunkte auf Entwicklungsprozesse des thorakalen und lumbalen Bereichs des embryonalen Körpers. Nun stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse auch mit den Gegebenheiten der kaudalen Region übereinstimmen.

4.3.1 Morphologischer Vergleich

Der Zeitpunkt der frühen Somitenreifung vollzieht sich in den kranial des Schwanzes gelegenen Regionen im Somitenstadium III/IV (Christ et al. 1994). Der epithelio-mesenchymale Übergang der sakralen und kozygealen Somiten vollzieht sich nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit im Somitenstadium II/III (excl. HH 17 und 23: III/IV). Ab den Stadien ohne neugebildete Somiten (HH 23) verschiebt sich der Übergang nach kaudal bis in Stadium HH 25 alle Somiten kompartimentiert sind. Der Unterschied zwischen dem thorakolumbalen Bereich und dem jetzt betrachteten sakrokokzygealen Bereich beträgt also ein Somitenstadium. Beachtet werden müssen auch die Somiten, die sich im epithelio-mesenchymalen Übergang befinden. Werden diese dem epithelialen Somitenzustand angerechnet, ist Somit IV der jeweils jüngste Somit mit Sklerotom. Dies entspricht den Ergebnissen von Christ und Ordahl (1995).

Das Sklerotom bildet sich aus dem ventralen Anteil des Somitenepithels und den Somitozölzellen. Durch die Auflösung des ventralen Epithels und der Basalmembran bildet sich an deren Stelle das Sklerotom (Jacob et al. 1975a). Im ventralen Somitenbereich ist auch der erste Nachweis des molekularen Markers *Pax1* zu sehen. Wie schon bekannt variiert die sklerotomale Zelldichte innerhalb der verschiedenen Somitenregionen (Verbout 1985). Am lateralen Randbereich stellt sie sich dichter dar als im medialen Bereich (Christ et al., 1992). Dies ist im Schwanzbereich des Hühnerembryos nicht so: sowohl im lateralen als auch im medialen Bereich liegen die sklerotomalen Zellen in ähnlicher Dichte aneinander. Bei jüngeren Embryonalstadien (HH 18) liegen die Zellen dichter als in den älteren Stadien (HH 24).

Der zellfreie Raum um die Chorda dorsalis ist zuerst mit extrazellulärer Matrix gefüllt und wird während der Somitendifferenzierung mit einwandernden Sklerotomzellen gefüllt (Jacob et al 1975). In den vorliegenden Untersuchungen findet die Einwanderung von

Sklerotomzellen langsam und auch erst relativ spät, ab dem Stadium HH 25, statt. Es verbleibt jedoch immer ein dünner zellfreier Raum direkt um die Chorda dorsalis.

4.3.2 Myotomaler Vergleich

In Untersuchungen zur Myotombildung stellen sich erste Myotomzellen in den Somitenstadien VI und VII dar. Durch Anfärben mit Anti-desmin-Antikörper sieht man die Myotomzellen zuerst am äußerst kranio-medialen Rand des Dermomyotoms (Kaehn et al., 1988; Tosney et al., 1994). Parallel zur Embryonalachse erstrecken sie sich anschließend an den kaudalen Rand des Dermomyotoms, welches einer Länge von bis zu 100 µm entspricht. *MyoD* ist in den frühen Stadien im dorsomedialen Quadranten von Somit II exprimiert und nachweisbar (Pownall and Emerson 1992). In der vorliegenden Studie stellt sich die *MyoD*-Expression im kaudalen Hühnerembryo ab den Somitenstadien III dar. Eine Ausnahme besteht bei den Stadien HH 17 und HH 21, wo erst Somit IV Anfärbung aufweist. Die volle Ausprägung der Färbungen besteht teilweise erst ein Somitenstadium später (HH 17, 18, 22). Die Dynamik der Myotomentwicklung ist folglich im kaudalen Achsenabschnitt leicht verzögert.

4.3.3 Sklerotomaler Vergleich

Nach der Somitenabschnürung wird ein Wechsel der Genexpression von *Pax3* und *Pax7* zu *Pax1* und *Pax9* beobachtet (Brand-Saberri et al., 1993; Goulding et al., 1994). Im Somitenstadium S III exprimieren die Zellen der ventralen Wand und des Somitozöls *Pax1* (Ebensperger et al., 1995). Diese Ergebnisse entsprechen denen der vorliegenden Arbeit im kaudalen Embryoabschnitt: Die *Pax1*-Expression ist in den meisten Stadien ab Somit III sichtbar. Ab dem Stadium HH 22 erscheint sie dann früher (Somit II), da nun keine neuen Somiten mehr gebildet werden. Ab HH 23 zeigen alle Somiten inklusive Somit I sklerotomale Genexpression.

Generell sind die Unterschiede der Entwicklung in Bezug auf die untersuchten Aspekte (Morphologie, epithelio-mesenchymaler Übergang der Somiten, Genexpressionen einzelner Somitenkompartimente) den kranialen Embryonalabschnitten sehr ähnlich. Die Dynamik und Abfolge der Somitogenese stimmen überein. Die Entwicklung variiert in Zeitpunkten (Beginn, Ende) und der eigentlichen Dauer. Diese Ergebnisse lassen sich vor dem Hintergrund der sekundären Körperentwicklung diskutieren. Holmdahl beschrieb 1925 die Entwicklung des Hühnerembryos in zwei aufeinander folgenden Phasen (primäre und sekundäre Körperentwicklung). Bei der primären Körperentwicklung entstehen die kranial axialen Strukturen, das Neuralrohr, die Chorda dorsalis und der primitive Darm aus den drei

Keimblättern im Zuge der Gastrulation. Im kaudalen Bereich des Embryos findet die sekundäre Körperentwicklung statt und unterscheidet sich darin, dass alle neugebildeten Strukturen (z. B. sekundäres Neuralrohr) aus den undifferenzierten Mesenchymzellen der Schwanzknospe entstehen. Der Ursprung dieser Mesenchymzellen besteht in den Resten des Hensen'schen Knotens und des Primitivstranges. Untersuchungen von Schoenwolf (1977, 1978, 1979) bestärken diese Theorie. Gegen die Annahme der geteilten Körperentwicklung sprechen Untersuchungen unter anderem von Catala (1996). Dieser vertrat die Theorie der Einheitlichkeit und Kontinuität von Vogt (1926). Er geht davon aus, dass die Gastrulationsprozesse des kranialen Embryos auch im kaudalen Anteil fortgeführt werden. Durch Huhn-Wachtel-Transplantationen bewiesen Catala et al. (1996) und Le Douarin et al. (1998), dass die im Schwanz liegende Ansammlung dichter Mesenchymzellen aus Epithelzellen der Neuralplatte entsteht. Vergleichbar dazu steht im kranialen Embryo die Struktur des primären Neuralrohrs.

Die Ergebnisse des epithelio-mesenchymalen Übergangs stimmen in morphologischer und molekularer Sicht im gesamten Embryo (kranial und kaudal) weitgehend überein. Dadurch bestärkt sich die Annahme, dass die kaudale Entwicklung auf dem Gastrulationsprozess des rostralen Embryos aufbaut. Der Entwicklungsmechanismus, der auch schon durch Knezevik (1998) durch gastrulationsähnliche Zellbewegungen im Embryonalschwanz in Augenschein gezogen wurde, scheint sich nach kaudal fortzuführen. Temporal mag er gering beschleunigt auftreten, da sich die Übergangsgrenzen der Somitogenese kaudal früher darstellen. Die Theorie der Einheitlichkeit und Kontinuität im Hühnerembryo rückt als in den Vordergrund.

4.4 Die fehlende Epithelialisierung des ventrolateralen Quadranten der Somiten I und II in den Stadium HH 18 und 19

In den Stadien HH 18 und 19 stellt sich transversal betrachtet in der Somitenbildung eine Unregelmäßigkeit dar. Der jüngste Somit I hat annähernd eckige Gestalt und ist nicht geschlossen epithelial. Im ventralen Saumbereich ist das Epithel offen. Bei Somit II in Stadium HH 18 verhält es sich genauso. In der sagittalen Ansicht hingegen stellen die Somiten I und II eine vollständig epitheliale Form dar. Zu erwarten gewesen wäre eine einheitliche Entwicklung, bei welcher die jüngsten zwei Somiten epithelial sind und danach Somit III beginnt, sich in Kompartimente umzuformen. Stattdessen besteht die deutliche Unterbrechung des epithelialen Saumes im ventromedialen Bereich. Hier fehlen die konzentrisch angeordneten, länglichen Epithelzellen. Statt ihrer sind lose Mesenchymzellen

vorhanden, die weit nach ventral bis an die Aorta bzw. nach medial bis an den Wolff'schen Gang reichen. In Stadium HH 20 hingegen ist der Wolff'sche Gang nicht mehr präsent. Durch Längenwachstum des embryonalen Körpers reicht dieser nicht bis in den Bereich der kaudalen Somiten. Hier (HH 20) sind die Somiten S I und II vollständig epithelial entwickelt. Aus diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, warum sich diese Somiten nach der Abschnürung von der Segmentplatte nicht vollständig epithelialisieren. Wird die Phase der epithelialen Somiten übersprungen oder abgekürzt? Hängt dieses Phänomen von Einflüssen umliegender Strukturen ab?

Ab dem Stadium HH 18 werden nur noch Somiten kaudal der Hintergliedmaße gebildet. Dementsprechend beginnt ein neuer Achsenabschnitt (Tailbud) im Hühnerembryo. Zwischen den Stadien HH 18 und 19 beginnt die embryonale Krümmung des Schwanzes nach ventral. Zu diesem Zeitpunkt besteht eine relativ lange Segmentplatte von ca. 500 µm. Durch das starke Längewachstum und die Krümmung des Schwanzes könnte eine beschleunigte Entwicklung auftreten. Diese geht mit einem dominierenden mesenchymalisierenden Effekt einher, der die Epithelialisierung im ventrolateralen Quadranten unterdrückt. Der Somit wird vom Zeitpunkt der Abschnürung von der Segmentplatte direkt in den kompartimentierten Zustand überführt. Der mesenchymalisierende Effekt ist von Beginn der Somitenbildung an vorhanden und dominiert hier den Vorgang der Epithelialisierung. In Stadium HH 19 werden dann die ersten Somiten gebildet, welche später die kranialen kokzygealen Wirbel bilden. Das Phänomen der fehlenden Epithelialisierung fällt also in den Bereich der letzten sakralen und ersten kokzygealen Somiten.

Auch die Anwesenheit des Wolff'schen Ganges könnte für eine fehlende Epithelialisierung sprechen, da dieser zeitgleich mit dem benannten Phänomen im kaudalen Embryo in Erscheinung tritt. Der Wolff'sche Gang erstreckt sich in Stadium HH 17 und HH 18 entlang der Längsachse bis zum jüngsten Somiten SI und liegt in Transversalebene ventrolateral des Somiten. Während der Somitenreifung reichen mesenchymale Zellen, welche später das Sklerotom bilden, bis an die epitheliale Wand des Wolff'schen Ganges. Der Wolff'sche Gang entspringt aus dem intermediären Mesoderm. Bevor er sich am zweiten Tag der Entwicklung in epitheliales Gewebe umwandelt, besteht er aus Mesenchym. Der Wolff'sche Gang ist zunächst unsegmentiert. Seine Spitze bleibt mesenchymal und wächst in kraniokaudale Richtung an die Kloake. Diese Migration scheint synchron mit der Somitogenese in Wellen zu verlaufen (Jacob et al., 1991). Die Wachstumszone des Wolff'schen Ganges liegt dabei etwas weiter kaudal als die der Somitenepithelialisierung. Die Entwicklung des Wolff'schen Ganges wird unter anderem von Fibronectin und Laminin gesteuert (Lash et al., 1984; Jacob

et al., 1991). Vor allem die Umwandlung von mesenchymalem zu epithelalem Gewebe wird von *Pax2* und *Pax8* gesteuert (Torres et al., 1995; Bouchard et al., 2002). Auch das Gen *Emx2* wird im Epithel exprimiert und fördert die Entwicklung des Wolff'schen Ganges. Ohne *Emx2* degeneriert der Wolff'schen Gang (Miyamoto et al., 1997). Das beim männlichen Tier vom Hoden gebildete Hormon Testosteron hält die Anlage und Entwicklung des Wolff'schen Ganges stabil (Jost et al., 1953). Es differenzieren sich der Nebenhodenkanal, der Samenleiter und die Samenblasendrüse. Weiterhin beeinflussen verschiedene Wachstumsfaktoren²¹ die Entwicklung der Wolff'schen Ganges. All diese Genexpressionen, Faktoren und Hormone befinden sich also in unmittelbarer Nähe zu den unvollständig epithelialisierten Somiten. Vor allem jene Gene, die die Weiterentwicklung nach dem epithelialen Zustand steuern, kommen in Frage, auch auf den Somiten Einfluss auszuüben und verfrüht einen mesenchymalen Zustand auszulösen. Dafür spricht vor allem die Tatsache, dass sich die fehlende Epithelialisierung am lateroventralen Bereich befindet, dem Epithelabschnitt also, dem der Wolff'sche Gang als nächstes liegt. Weiterführende Untersuchungen müssen den Sachverhalt klären.

²¹ Egf epidermal growth factor; GH growth hormone; Igf insulin-like growth factor

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bildung und Reifung der sakralen und kokzygealen Somiten. Es handelt sich um eine systematische Übersicht, welche den Zeitpunkt des epithelio-mesenchymalen Übergangs in morphologischer und molekularer Sicht darstellt. Zum einen wurde die Morphologie des zunächst epithelialen und später kompartimentierten Somiten in semidünnen Schnitten untersucht. Zum anderen wurden molekulare Marker des Sklerotoms und des Myotoms dargestellt, die den Zeitpunkt der Kompartimentierung festlegen. Das Kompartiment Sklerotom wurde durch In situ-Hybridisierung mit dem Gen *Pax1* dargestellt, das Myotom durch die Gene *MyoD* und *Myf5*, sowie durch das Protein MF20 ergänzt. Es wurden die Stadien HH 17 bis HH 27 (nach Hamburger und Hamilton) untersucht, wobei im Stadium HH 17, 18 und 19 sakrale Somiten gebildet werden und in den Stadien HH 19, 20, 21, 22 und 23 kokzygeale Somiten.

Morphologie: Der zunächst noch epitheliale Somit entwickelt sich im Somitenstadium III bzw. IV in seine Kompartimente Sklerotom und Dermomyotom. Im Stadium HH 24 vollzieht sich der epithelio-mesenchymale Übergang bei Somit II. Ab Stadium HH 25 sind alle Somiten vollständig kompartimentiert. Als Besonderheit wurde eine nicht vollständige Epithelialisierung bei den Somiten I und II der Stadien HH 18 und 19 festgestellt.

Sklerotom-Darstellung durch *Pax1*: Die Expression von *Pax1* erscheint zunächst bei Somitenstadium III. Ab dem Stadium HH 22 erscheint sie schon bei Somit II; ab Stadium HH 25 enthalten alle Somiten *Pax1*-exprimierende Zellen. Die Expression zeichnet sich zunächst im dorsoventralen Sklerotomwinkel ab und weitet sich dann nach lateral aus.

Myotom-Darstellung durch *MyoD*: Die ersten *MyoD*-exprimierenden Zellen treten bei den Somitenstadien III bzw. IV auf. Hier befindet sich die Expression zuerst im medialen Anteil und erstreckt sich später nach lateral, direkt ventral des Dermomyotoms. Ab dem Stadium HH 23 erscheint die *MyoD*-Expression des Myotoms bei Somit II. Ab Stadium HH 24 enthalten alle Somiten *MyoD*-exprimierende Zellen.

Myotom-Darstellung durch *Myf5*: *Myf5* wird in den Stadien HH 17 und HH 18 bei Somit III erstmals exprimiert. Die Stadien HH 19 und HH 22 bis HH 24 enthalten *Myf5*-exprimierende Zellen bei Somitenstadium II. Das Somitenstadium IV bei HH 20 und HH 21 zeigt eine *Myf5*-Expression. Ab HH 25 enthalten alle Somiten *Myf5*-exprimierende Zellen.

Die Untersuchungen ergeben, dass der Prozess der Bildung und Reifung der kaudalen Somiten in gleicher Weise verläuft wie bei den kranialen Somiten. Jedoch vollzieht sich der

epithelio-mesenchymale Übergang im kaudalen Embryoanteil ein Somitenstadium früher. Hier entwickeln sich die Somiten also schneller. Die Somitogenese verläuft beschleunigt ab.

5.1 Summary

The presented study explores the formation and maturation of sacral and coccygeal somites. It provides a systematic overview of the time of the epithelio-mesenchymale transition from both a morphological and a molecular method point of view. On the one hand, the morphology of the firstly epithelial and then subdivided somite was analysed in semithin-slides. On the other hand, molecular markers of compartments were used to indicate when compartmentalization starts. The compartments sclerotome and dermomyotome were observed using in situ-hybridisation with the genes *Pax1*, and *MyoD* and *Myf5*, respectively; additionally, MF20-analysis was performed. The developmental stages of chick embryo (characterized by Hamburger and Hamilton) were explored from HH 17 to HH 27, whereas sacral somites are formed in HH 17, 18 and 19, coccygeal somites in HH 19, 20, 21, 22 and 23.

Morphology: The epithelial somite develops into compartments sclerotome and dermomyotome at the stage of somite III and IV. At HH 24 the epithelio-mesenchymal transition occurs at stage of somite II; from HH 25 onwards all of the somites are transformed completely. It is worth noting, that at HH 18 and 19 the formation of the epithelial ball of somites I and II is incomplete.

Labelling of sclerotome by *Pax1*: *Pax1* is expressed at stage of somite III for the first time. From HH 22, the expression appears at somite II; from HH 25 all somites include cells that express *Pax1*. Signaling begins at the dorsoventral angle of the sclerotome and extends laterally later on.

Labelling of myotome by *MyoD*: The first cells who express *MyoD* appear at stage of somite III and IV. At first, signaling can be observed at the medial part and then extends laterally, ventral of the dermomyotome. At HH 23, signaling of the myotome occurs at stage of somite II; from HH 24 all somites show expression of *MyoD*.

Labelling of myotome by *Myf5*: At HH 17 and HH 18, *Myf5* is expressed for the first time at stage of somite III by in situ-hybridisation. At HH 19 and from HH 22 to 24 *Myf5*-expression appears at stage of somite II. Stage of somite IV expresses *Myf5* between HH 20 and 21. From HH 25 all somites show expression of *Myf5*.

In conclusion, the study shows that the developments of caudal and of cranial somites happen in the same way. However, the epithelio-to-mesenchymal transition in the caudal region

occurs one stage of somite earlier; thus demonstrating the caudal development of somites is faster than the cranial development of somites.

6 Literaturverzeichnis

- Amprimo R, Amprimo bonetti D, Ambosi G (1969) Observations on the developmental relations between ectoderm and mesoderm of the chick embryo tail. Acta Anat (Suppl 56) **73**: 1-26
- Aulehla, A., C. Wehrle, et al. (2003). "Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis." Dev Cell **4**(3): 395-406.
- Balfour FM (1881) Handbuch der vergleichenden Embryologie 2. Band, Fischer Jena
- Balling, R., U. Helwig, et al. (1996). "Pax genes and skeletal development." Ann N Y Acad Sci **785**: 27-33.
- Bellairs, R. (1986). "The primitive streak." Anat Embryol (Berl) **174**(1): 1-14.
- Bellairs, R. and E. J. Sanders (1986). "Somitomers in the chick tail bud: an SEM study." Anat Embryol (Berl) **175**(2): 235-40.
- Bober, E., T. Franz, et al. (1994). "Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells." Development **120**(3): 603-12.
- Borycki, A. G., K. E. Strunk, et al. (1997). "Distinct signal/response mechanisms regulate pax1 and QmyoD activation in sclerotomal and myotomal lineages of quail somites." Dev Biol **185**(2): 185-200.
- Bouchard, M., A. Souabni, et al. (2002). "Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8." Genes Dev **16**(22): 2958-70.
- Brand-Saberi, B. and B. Christ (1993). "Inhibition of myogenic cell migration by the application of antibodies raised against limb bud mesenchyme." Prog Clin Biol Res **383B**: 541-52.
- Brand-Saberi, B. and B. Christ (2000). "Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites." Curr Top Dev Biol **48**: 1-42.
- Brand-Saberi, B., C. Ebensperger, et al. (1993). "The ventralizing effect of the notochord on somite differentiation in chick embryos." Anat Embryol (Berl) **188**(3): 239-45.
- Brent, A. E. and C. J. Tabin (2002). "Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon." Curr Opin Genet Dev **12**(5): 548-57.
- Burke, A. C. (2000). "Hox genes and the global patterning of the somitic mesoderm." Curr Top Dev Biol **47**: 155-81.
- Burke, A. C., C. E. Nelson, et al. (1995). "Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology." Development **121**(2): 333-46.

- Catala, M., M. A. Teillet, et al. (1996). "A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls." Development **122**(9): 2599-610.
- Catala, M., M. A. Teillet, et al. (1995). "Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system." Mech Dev **51**(1): 51-65.
- Christ, B., B. Brand-Saberi, et al. (1992). "Local signalling in dermomyotomal cell type specification." Anat Embryol (Berl) **186**(5): 505-10.
- Christ, B., R. Huang, et al. (2004). "Formation and differentiation of the avian sclerotome." Anat Embryol (Berl) **208**(5): 333-50.
- Christ, B., R. Huang, et al. (2000). "The development of the avian vertebral column." Anat Embryol (Berl) **202**(3): 179-94.
- Christ, B., H. J. Jacob, et al. (1972). "[Experimental analysis of somitogenesis in the chick embryo]." Z Anat Entwicklungsgesch **138**(1): 82-97.
- Christ, B., H. J. Jacob, et al. (1974). "[Origin of wing musculature. Experimental studies on quail and chick embryos]." Experientia **30**(12): 1446-9.
- Christ, B., H. J. Jacob, et al. (1977). "Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos." Anat Embryol (Berl) **150**(2): 171-86.
- Christ, B., H. J. Jacob, et al. (1977). "[Experimental findings on muscle development in the limbs of the chick embryo]." Verh Anat Ges(71 Pt 2): 1231-7.
- Christ, B., H. J. Jacob, et al. (1979). "Differentiating abilities of avian somatopleural mesoderm." Experientia **35**(10): 1376-8.
- Christ, B., M. Jacob, et al. (1983). "On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study." Anat Embryol (Berl) **166**(1): 87-101.
- Christ, B. and C. P. Ordahl (1995). "Early stages of chick somite development." Anat Embryol (Berl) **191**(5): 381-396.
- Conlon, R. A., A. G. Reaume, et al. (1995). "Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites." Development **121**(5): 1533-45.
- Couly, G. F., P. M. Coltey, et al. (1993). "The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras." Development **117**(2): 409-29.
- Criley, B. B. (1969). "Analysis of embryonic sources and mechanisms of development of posterior levels of chick neural tubes." J Morphol **128**(4): 465-501.

- Deutsch, U., G. R. Dressler, et al. (1988). "Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development." Cell **53**(4): 617-25.
- Dubrulle, J., M. J. McGrew, et al. (2001). "FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation." Cell **106**(2): 219-32.
- Duprez, D., C. Fournier-Thibault, et al. (1998). "Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb." Development **125**(3): 495-505.
- Ebensperger, C., J. Wilting, et al. (1995). "Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos." Anat Embryol (Berl) **191**(4): 297-310.
- Fan, C. M., J. A. Porter, et al. (1995). "Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway." Cell **81**(3): 457-65.
- Fan, C. M. and M. Tessier-Lavigne (1994). "Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog." Cell **79**(7): 1175-86.
- George-Weinstein, M., J. Gerhart, et al. (1996). "Skeletal myogenesis: the preferred pathway of chick embryo epiblast cells in vitro." Dev Biol **173**(1): 279-91.
- Gossler, A. and M. Hrabe de Angelis (1998). "Somitogenesis." Curr Top Dev Biol **38**: 225-87.
- Goulding, M., A. Lumsden, et al. (1994). "Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development." Development **120**(4): 957-71.
- Griffith, C. M., M. J. Wiley, et al. (1992). "The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue." Anat Embryol (Berl) **185**(2): 101-13.
- Gros, J., M. Scaal, et al. (2004). "A two-step mechanism for myotome formation in chick." Dev Cell **6**(6): 875-82.
- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. **88**, 49-92
- Handrigan, G. R. (2003). "Concordia discors: duality in the origin of the vertebrate tail." J Anat **202**(Pt 3): 255-67.
- Hatschek (1880) Cited after Williams LW (1910) The somites of the chick. Am, J Anat **11**:55-100.

- Hirano, S., R. Hirako, et al. (1995). "Morphological analysis of the role of the neural tube and notochord in the development of somites." Anat Embryol (Berl) **192**(5): 445-57.
- Holmdahl, D.E. (1925a) Experimentelle Untersuchungen über die Lage der Grenze zwischen primärer und sekundärer Körperentwicklung beim Huhn. Anat Anz **59**: 393-396.
- Holmdahl, D.E. (1925b): Die Erste Entwicklung des Körpers bei den Vögeln und Säugetieren, inkl. dem Menschen, besonders mit Rücksicht auf die Bildung des Rückenmarks, des Zöloms und der entodermalen Kloake nebst einem Exkurs über die Entstehung der Spina bifida in der Lumbosakral region I. Gegenbaurs Morph. Jahrb. **54**, 333-384.
- Holmdahl, D.E. (1925c): Die Erste Entwicklung des Körpers bei den Vögeln und Säugetieren, inkl. dem Menschen, besonders mit Rücksicht auf die Bildung des Rückenmarks, des Zöloms und der entodermalen Kloake nebst einem Exkurs über die Entstehung der Spina bifida in der Lumbosakral region II - V. Gegenbaurs Morph. Jahrb. **54**, 112-208.
- Huang, R., Q. Zhi, et al. (2000). "New experimental evidence for somite resegmentation." Anat Embryol (Berl) **202**(3): 195-200.
- Huang, R., Q. Zhi, et al. (1999). "Origin and development of the avian tongue muscles." Anat Embryol (Berl) **200**(2): 137-52.
- Hughes, A. F. and R. B. Freeman (1974). "Comparative remarks on the development of the tail cord among higher vertebrates." J Embryol Exp Morphol **32**(2): 355-63.
- Iimura, T., X. Yang, et al. (2007). "Dual mode of paraxial mesoderm formation during chick gastrulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2744-9.
- Jacob, H. J., B. Christ, et al. (1975). "[Effect of surrounding tissue on the morphogenesis of spinal cord in chick embryo]." Verh Anat Ges **69**: 271-4.
- Jacob, M., B. Christ, et al. (1979). "The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos. An ultrastructural study." Anat Embryol (Berl) **157**(3): 291-309.
- Jacob, M., B. Christ, et al. (1991). "The role of fibronectin and laminin in development and migration of the avian Wolffian duct with reference to somitogenesis." Anat Embryol (Berl) **183**(4): 385-95.
- Johnson, R. L., E. Laufer, et al. (1994). "Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites." Cell **79**(7): 1165-73.
- Jost, A., P. Gonse-Danysz, et al. (1953). "[Studies on physiology of fetal hypophysis in rabbits and its relation to testicular function.]" J Physiol (Paris) **45**(1): 134-6.

- Kaehn, K., H. J. Jacob, et al. (1988). "The onset of myotome formation in the chick." Anat Embryol (Berl) **177**(3): 191-201.
- Kaestner, K. H., S. C. Bleckmann, et al. (1996). "Clustered arrangement of winged helix genes fkh-6 and MFH-1: possible implications for mesoderm development." Development **122**(6): 1751-8.
- Klika, E. and R. Jelinek (1969). "The structure of the end and tail bud of the chick embryo." Folia Morphol (Praha) **17**(1): 29-40.
- Knezevic, V., R. De Santo, et al. (1998). "Continuing organizer function during chick tail development." Development **125**(10): 1791-801.
- Krenn, V., H. Ostermayer, et al. (1990). "On the histogenetic potency of the tailbud mesoderm." Anat Embryol (Berl) **181**(6): 595-601.
- Lash, J. W., A. W. Seitz, et al. (1984). "On the role of fibronectin during the compaction stage of somitogenesis in the chick embryo." J Exp Zool **232**(2): 197-206.
- Le Douarin, N. M., M. A. Teillet, et al. (1998). "Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras." Int J Dev Biol **42**(7): 909-16.
- Marcelle, C., S. Ahlgren, et al. (1999). "In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog." Dev Biol **214**(2): 277-87.
- Mathis, L., P. M. Kulesa, et al. (2001). "FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen's node progression." Nat Cell Biol **3**(6): 559-66.
- Mauger, A. (1972). "[The role of somitic mesoderm in the development of dorsal plumage in chick embryos. II. Regionalization of the plumage-forming mesoderm]." J Embryol Exp Morphol **28**(2): 343-66.
- Menkes, J. H. and G. A. Jervis (1961). "Developmental retardation associated with an abnormality in tyrosine metabolism. Report of a case." Pediatrics **28**: 399-409.
- Mills, C. L. and R. Bellairs (1989). "Mitosis and cell death in the tail of the chick embryo." Anat Embryol (Berl) **180**(3): 301-8.
- Miyamoto, N., M. Yoshida, et al. (1997). "Defects of urogenital development in mice lacking Emx2." Development **124**(9): 1653-64.
- Monsoro-Burq, A. H., D. Duprez, et al. (1996). "The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development." Development **122**(11): 3607-16.
- Muller, T. S., C. Ebensperger, et al. (1996). "Expression of avian Pax1 and Pax9 is intrinsically regulated in the pharyngeal endoderm, but depends on environmental influences in the paraxial mesoderm." Dev Biol **178**(2): 403-17.

- Munsterberg, A. E., J. Kitajewski, et al. (1995). "Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite." Genes Dev **9**(23): 2911-22.
- Munsterberg, A. E. and A. B. Lassar (1995). "Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite." Development **121**(3): 651-60.
- Packard, D. S., Jr. (1978). "Chick somite determination: the role of factors in young somites and the segmental plate." J Exp Zool **203**(2): 295-306.
- Packard, D. S., Jr. and S. Meier (1983). "An experimental study of the somitomeric organization of the avian segmental plate." Dev Biol **97**(1): 191-202.
- Palmeirim, I., D. Henrique, et al. (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." Cell **91**(5): 639-48.
- Pasteels, J. (1939) La formation de la queue chez les Vertébrés. Ann. Soc. Royale Zool. De Belgique **70**, 33-51
- Pourquie, O. (1999). "Notch around the clock." Curr Opin Genet Dev **9**(5): 559-65.
- Pownall, M. E. and C. P. Emerson, Jr. (1992). "Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos." Dev Biol **151**(1): 67-79.
- Remak, R. (1850) Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbeltiere. Berlin: Reimer
- Rickmann, M., J. W. Fawcett, et al. (1985). "The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite." J Embryol Exp Morphol **90**: 437-55.
- Sanders, E. J., M. K. Khare, et al. (1986). "An experimental and morphological analysis of the tail bud mesenchyme of the chick embryo." Anat Embryol (Berl) **174**(2): 179-85.
- Sawada, A., M. Shinya, et al. (2001). "Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation." Development **128**(23): 4873-80.
- Scaal, M. and B. Christ (2004). "Formation and differentiation of the avian dermomyotome." Anat Embryol (Berl) **208**(6): 411-24.
- Schoenwolf, G. C. (1979). "Histological and ultrastructural observations of tail bud formation in the chick embryo." Anat Rec **193**(1): 131-47.
- Schoenwolf, G. C. (1981). "Morphogenetic processes involved in the remodeling of the tail region of the chick embryo." Anat Embryol (Berl) **162**(2): 183-97.

- Schoenwolf, G. C., N. B. Chandler, et al. (1985). "Analysis of the origins and early fates of neural crest cells in caudal regions of avian embryos." Dev Biol **110**(2): 467-79.
- Schoenwolf, G. C. and J. Delongo (1980). "Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo." Am J Anat **158**(1): 43-63.
- Schoenwolf, G. C. and R. O. Kelley (1980). "Characterization of intercellular junctions in the caudal portion of the developing neural tube of the chick embryo." Am J Anat **158**(1): 29-41.
- Schoenwolf, G. C. and J. L. Smith (1990). "Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances." Development **109**(2): 243-70.
- Smith, J. and J. C. McLachlan (1989). "Developmental pattern of growth factor production in chick embryo limb buds." J Anat **165**: 159-168.
- Solursh, M., M. Fisher, et al. (1979). "The role of extracellular matrix in the formation of the sclerotome." J Embryol Exp Morphol **54**: 75-98.
- Stern, C. D., S. M. Sisodiya, et al. (1986). "Interactions between neurites and somite cells: inhibition and stimulation of nerve growth in the chick embryo." J Embryol Exp Morphol **91**: 209-26.
- Teillet, M. A., F. Lapointe, et al. (1998). "The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11733-8.
- Tibbles, L. and M. J. Wiley (1988). "A comparative study of the effects of retinoic acid given during the critical period for inducing spina bifida in mice and hamsters." Teratology **37**(2): 113-25.
- Torres, M., E. Gomez-Pardo, et al. (1995). "Pax-2 controls multiple steps of urogenital development." Development **121**(12): 4057-65.
- Tosney, K. W., D. B. Dehnbostel, et al. (1994). "Neural crest cells prefer the myotome's basal lamina over the sclerotome as a substratum." Dev Biol **163**(2): 389-406.
- Trelstad, R. L. (1977). "Mesenchymal cell polarity and morphogenesis of chick cartilage." Dev Biol **59**(2): 153-63.
- Verbout, A. J. (1985). "The development of the vertebral column." Adv Anat Embryol Cell Biol **90**: 1-122.
- Vogt, W. (1926) Über Wachstum und Gestaltungsbewegungen am hinteren Körperende der Amphibien. Anat. Anz. **61**, 62-75.
- Williams, L.W. (1910) The somites of the chick. Am J Anat **11**: 55-100.

- Williams, B. A. and C. P. Ordahl (1994). "Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification." Development **120**(4): 785-96.
- Wilting, J., B. Brand-Saberi, et al. (1995). "Angiogenic potential of the avian somite." Dev Dyn **202**(2): 165-71.
- Winnier, G. E., L. Hargett, et al. (1997). "The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo." Genes Dev **11**(7): 926-40.
- Zhi, Q., R. Huang, et al. (1996). "Participation of individual brachial somites in skeletal muscles of the avian distal wing." Anat Embryol (Berl) **194**(4): 327-39.

8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. M. Scaal gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die Einarbeitung und weitere Betreuung im Labor, die gewährte Unterstützung und Korrektur der Arbeit.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, der durch seine Betreuung diese Arbeit überhaupt möglich gemacht hat.

Auch Herrn Prof. Dr. M. Lierz möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung für Molekulare Embryologie, der Albert-Ludwig-Universität Freiburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit über das Fachliche hinaus. Insbesondere danke ich Anja Maschner, Susanne Theiss, Stefanie Krück, Christoph Wiegrefe und Dr. Venugopal Rao Mittapalli für die unermüdliche Hilfestellung und die anregenden fachlichen Diskussionen. Für die praktische und technische Unterstützung danke ich Ute Baur, Ellen Gimbel, Lidia Koschny und Günter Frank.

Meinen Eltern, meinen Schwestern und Freunden gilt der größte Dank, da deren beständige Unterstützung und Beratung mir die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Kathrin Heim



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



ISBN: 978-3-8359-5735-0



9 783835 195735 0

