

**Experimentelle Studie zur Dokumentation des Ablaufs
der okzipitalen und zervikalen Somitenreifung
beim Hühnerembryo**

ANJA MASCHNER



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 2010

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 2010

© 2010 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
dem Institut für Anatomie und Zellbiologie (Lehrstuhl II)
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
Betreuer: Prof. Dr. Martin Scaal

**Experimentelle Studie zur Dokumentation des Ablaufs der
okzipitalen und zervikalen Somitenreifung beim Hühnerembryo**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Anja Maschner

Tierärztin aus Freiburg im Breisgau

Gießen 2010

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Bergmann

Prof. Dr. Martin Scaal

Tag der Disputation: 19.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung/Literaturverzeichnis	4
1.1. Gastrulation	4
1.2. Somitenbildung	6
1.2.1. Segmentierung	6
1.2.2. Epithelialisierung	7
1.3. Somitenkompartimentierung	7
1.4. Somitenumgebung	8
1.5. <i>Pax1</i> - Expression und Sklerotomentwicklung	8
1.6. <i>MyoD</i> - Expression, Dermomyotom- und Myotomentwicklung	9
1.7. Unsegmentiertes Kopfmesoderm	10
1.8. Der erste Somit	10
1.9. Derivate okzipitaler Somiten	12
1.10. Das kaudale Ende des Embryos	12
1.11. Fragestellung und Vorgehensweise	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Tiere: Hühnerembryonen	15
2.2. Isolation und Einteilung in Stadien	15
2.3. Benennung der Somiten	15
2.4. Einbetten in Kunstharz	15
2.5. Herstellung von Semidünnschnitten für die histologische Untersuchung	16
2.6. Färbung und Deckelung der Semidünnschnitte	16
2.7. Whole-mount In-situ-Hybridisierung	16
2.8. Herstellung von Vibratomschnitten zur histologische Untersuchung der in situ hybridisierten whole mounts	18
2.9. Mikroskopie und Fotografie	18
2.10. Chemische Reagenzien und Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	19
2.10.1. Vorbehandlung und Einbetten in Kunstharz	19
2.10.2. Färbelösung für Semidünnschnitte	19
2.10.3. Lösungen für die whole-mount In-situ-Hybridisierung	19
3. Ergebnisse	22
3.1. Stadien mit epithelialen Somiten	22
3.2. Stadien mit epithelio-mesenchymalem Übergang	25

3.3. In-situ-Hybridisierung	33
3.3.1. <i>Pax1</i> (Sklerotom)	33
3.3.2. <i>MyoD</i> (Myotom)	40
3.3.3. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	43
4. Diskussion	45
4.1. Anzahl epithelialer Somiten	45
4.2. Zeitpunkt des ersten epithelio-mesenchymalen Übergangs	45
4.3. Epithelio-mesenchymaler Übergang in den Stadien HH 11-HH 15	46
4.4. <i>Pax1</i> Expression	47
4.5. <i>MyoD</i> Expression	48
5. Zusammenfassung/Summary	50
6. Literatur	52
7. Danksagung	58
8. Erklärung	59

1. Einleitung/Literaturverzeichnis

1.1. Gastrulation

Somiten sind segmentale Strukturen des paraxialen Mesoderms. Das paraxiale Mesoderm entsteht im Rahmen der Gastrulation aus der zunächst zweiblättrigen Keimscheibe, die aus Epiblast und Hypoblast besteht.

In der oberen Zellschicht, dem Epiblasten, entsteht der Primitivstreifen, der sich zunehmend verlängert. Hierbei bildet sich in der Mitte die Primitivrinne und am vorderen Ende der Primitivknoten. Im Knotenbereich endet die Primitivrinne als Primitivgrube.

Aus dem Bereich des Primitivstreifens und des Primitivknotens wandern Zellen aus, die das mittlere Keimblatt, das Mesoderm, bilden. Das Mesoderm entsteht neu, wohingegen das Endoderm die bereits bestehende untere Zellschicht, den Hypoblasten, ersetzt.

Die definitiven Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm entstehen aus dem Epiblasten und sind das Anlagenmaterial der verschiedenen Gewebe.

Derivate des Ektoderms sind das Neuralrohr, die Neuralleiste und das Oberflächenektoderm.

Das Mesoderm gliedert sich in vier verschiedene Abschnitte:

1. Das axiale Mesoderm
2. Das paraxiale Mesoderm
3. Das intermediäre Mesoderm
4. Das Seitenplattenmesoderm, auch laterales Mesoderm genannt

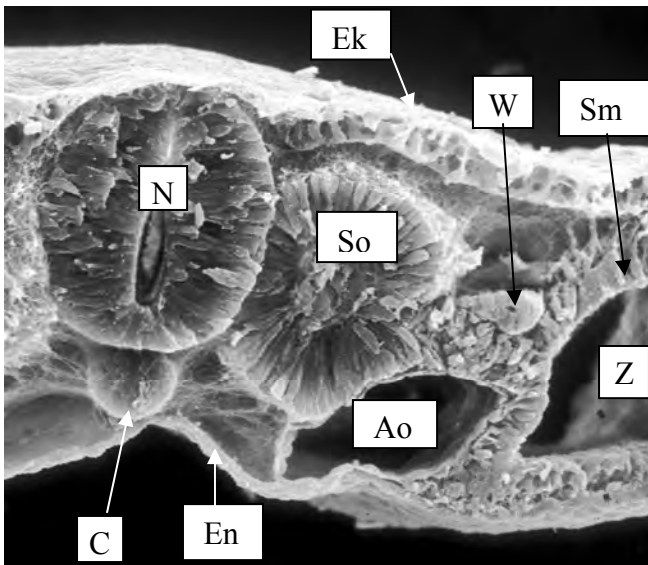
Das axiale Mesoderm geht aus dem Primitivknoten hervor. Es schiebt sich stabförmig zwischen Ektoderm und Endoderm nach kranial und bildet die Längsachse des Embryos. Der kranialste Teil des axialen Mesoderms ist mesenchymal strukturiert und wird als prächordales Mesoderm bezeichnet (Christ 1998). Aus dem axialen Mesoderm entsteht die Chorda dorsalis, das primitive Achsenskelett. Von der Chorda dorsalis gehen Signale aus, welche die Bildung und Differenzierung des Neuralrohres und später auch der Somiten initiieren (Goulding et al. 1993).

Das paraxiale Mesoderm liegt zwischen dem intermediären Mesoderm und den axialen Strukturen. Der mediale Anteil des paraxialen Mesoderms geht aus dem Primitivknoten hervor, der laterale Anteil aus dem anterioren Primitivstreifen. Am paraxialen Mesoderm unterscheidet man einen präotischen und einen postotischen Anteil. Das paraxiale präotische Mesoderm bleibt unsegmentiert. Das postotische paraxiale Mesoderm besitzt die Fähigkeit zur Segmentierung und Epithelialisierung, also zur Bildung von Somiten. Der Anteil des postotischen paraxialen Mesoderms, der noch nicht segmentiert ist, wird als Segmentplatte bezeichnet.

Das intermediäre Mesoderm liegt lateral vom paraxialen Mesoderm und geht aus weiter kaudal gelegenen Teilen des Primitivstreifens hervor. Es beinhaltet den Wolff'schen Gang und einen Saum

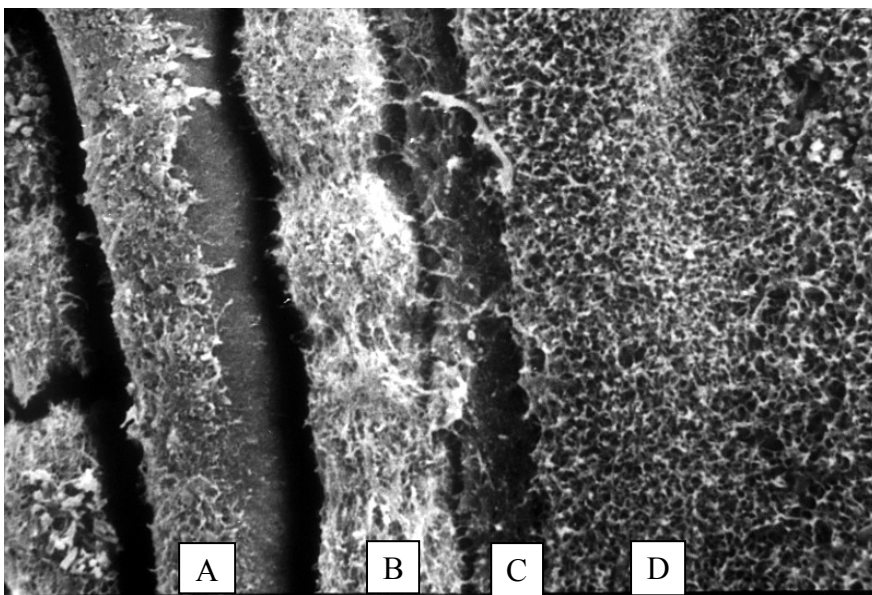
von Gewebe, welches das paraxiale vom lateralen Mesoderm trennt.

Das Seitenplattenmesoderm geht ebenfalls aus kaudalen Anteilen des Primitivstreifens hervor und besteht aus zwei Anteilen, der Somatopleura und Splanchnopleura. Diese liegen zwischen Ektoderm und Endoderm. Der Raum zwischen beiden Blättern ist das Zölom.



- N: Neuralrohr
- C: Chorda dorsalis
- So: Somit
- W: Wolffscher Gang
- Sm: Seitenplattenmesoderm
- Z: Zölom
- Ek: Ektoderm
- En: Endoderm
- Ao: Aorta

Abb 1a: elektronenmikroskopische Aufnahme, Transversalschnitt eines 2 d alten Hühnerembryos, Foto: H.J. Jacob, Bochum



- A: axiales Mesoderm bestehend aus Neuralrohr und Chorda dorsalis
- B: paraxiales Mesoderm, postotisches bildet Somiten
- C: intermediäres Mesoderm, Wolffscher Gang
- D: Seitenplatten oder laterales Mesoderm, Somatopleura und Splanchnopleura

Abb.1b: elektronenmikroskopische Aufnahme zur Darstellung des Mesoderms, Aufsicht auf einen Hühnerembryo von dorsal, Foto: H.J. Jacob, Bochum

1.2. Somitenbildung

Der Ausdruck „Somit“ wurde erstmals von Balfour 1881 (Balfour 1881) eingeführt. Er ersetzte die Bezeichnungen „Urwirbel“ oder „Protovertebra“ wie die Somiten zuvor von Remak (Remak 1850) benannt wurden. Die erste detaillierte Beschreibung der Somiten des Hühnerembryos erfolgte von Williams 1910 (Williams 1910).

Die Somiten schnüren sich in kraniokaudaler Richtung von der Segmentplatte ab (Christ und Ordahl 1995). Diese Abschnürung erfolgt jeweils paarweise auf beiden Seiten der axialen Strukturen des Neuralrohres und der Chorda dorsalis. Währenddessen werden neue Mesenchymzellen am kaudalen Ende des paraxialen Mesoderms durch anhaltende Gastrulation eingegliedert. Der erste Somit befindet sich hinter der Ohrplakode, der letzte im Schwanz.

Vor der Somitogenese kann in der Segmentplatte eine metamere Anordnung der Mesenchymzellen beobachtet werden. Die sogenannten Somitomere stellen das Segmentierungsmuster der Segmentplatte dar (Jacobson 1988). Die Somitomere sind bei einzelnen Spezies konstant. Bei Hühner- und Wachtelembrionen wurden 10 bis 12 Somitomere beschrieben (Packard 1978; Packard und Meier 1983). Diese Muster entsprechen den zukünftigen Somiten.

Vogelembryonen besitzen am Ende eines Segmentierungsprozesses 52 Somitenpaare.

Alle 90 Minuten wird ein Somitenpaar vom präsomitischen paraxialen Mesoderm abgeschnürt (Packard et al. 1993).

Die Somitenbildung besteht aus zwei Prozessen: der Segmentierung und der Epithelialisierung.

1.2.1. Segmentierung

Die Segmentierung des paraxialen Mesoderms (Segmentplatte) führt zur Bildung von Somiten und wird gefolgt von der Epithelialisierung der Zellen (Christ et al. 1972).

Die Segmentierung wird durch molekulare Mechanismen gesteuert, die als Segmentierungsuhr bezeichnet werden. Diese ist definiert durch die periodische Expression von Genen. Der erste Hinweis auf die Existenz einer „Uhr“ wurde durch Nachforschungen zum c-hairy-1-Gen an Hühnerembryonen gefunden (Palmeirim et al. 1997).

Mittlerweile wurden 32 oszillierende Gene bei Mäusen identifiziert. Es wird geschätzt, dass die vollständige Zahl dieser oszillierenden Gene zwischen 50 und 100 liegt (Dequeant et al. 2006).

Die Welle der Gene bewegt sich im paraxialen Mesoderm von kaudal nach kranial.

Im Falle von c-hairy-1 wird das Gen innerhalb einzelner Zellen im PSM (Präsomitisches Mesoderm) in einem „an/aus- Rhythmus“ exprimiert. Dieser beginnt während der Gastrulation und wird während der ganzen Somitogenese aufrechterhalten. Die Expression des Gens wird so lange im kaudalen Teil des Somiten beobachtet, bis dieser vom PSM abgeschnürt ist (Sparrow et al. 2007).

Es wird angenommen, dass die Segmentierungsuhr festlegt, wann die Somitengrenzen fixiert werden, woran der FgF-8- Gradient beteiligt ist (Tabin und Johnson 2001). Auch bei der Festlegung der Somitengröße spielt der Wachstumsfaktor FgF-8 eine Rolle (Dubrulle et al. 2001).

1.2.2. Epithelialisierung

Noch vor der morphologisch sichtbaren Segmentierung erfolgt eine Umwandlung der Mesenchymzellen in epitheliale Zellen. Von diesem Vorgang der Epithelialisierung sind die Zellen im Innern des Somiten ausgeschlossen. Diese behalten ihren mesenchymalen Charakter bei und werden als Somitozölzellen bezeichnet. Die epithelialen Zellen ordnen sich um das Somitocoel herum neu an. Sie haben eine flaschenartige Form und liegen mit dem Flaschenhals zum Zentrum hin. Eine Basalmembran bedeckt die äußere Oberfläche der epithelialen Somiten (Christ et al. 2004).

Die Somitozölzellen sind beteiligt an der Ausbildung von Zwischenwirbelscheiben, Zwischenwirbelverbindungen und der proximalen Rippen (Huang et al. 1994; Huang et al. 1996; Huang et al. 2000; Mittapalli et al. 2005).

Im Anschluss an die Segmentierung und Epithelialisierung erfolgt die Kompartimentierung der Somiten.

1.3. Somitenkompartimentierung

Unter der Kompartimentierung der Somiten versteht man die Entstehung von Sklerotom und Dermomyotom. Dies geht mit einer epithelio-mesenchymalen Umwandlung (EMT) der ventralen Somitenzellen einher. Die Kompartimentierung erfolgt in kranio-kaudaler Richtung.

Aus der dorsalen Hälfte der Somiten entsteht das Dermomyotom, aus der ventralen Hälfte das Sklerotom (Christ et al. 1978). Dabei spricht man von einer dorso-ventralen Kompartimentierung.

Die Somitozölzellen werden Teil des Sklerotoms (Huang et al. 1994).

Die dorsalen Somitenzellen, welche zum Dermomyotom werden, bleiben zunächst epithelial, die ventralen Somitenzellen unterliegen einer epithelio-mesenchymalen Umwandlung (EMT) und werden zum Sklerotom.

Einzelne epitheliale Zellen wandern von der dorsomedialen Lippe des Dermomyotoms in kaudale Richtung unter das Dermomyotom. Diese postmitotischen Zellen werden als Myotom bezeichnet (Christ und Ordahl 1995).

Die kompartimentierten Somiten lassen sich außerdem in eine kraniale und kaudale Hälfte unterteilen (Remak 1850; Ebner 1888; Brand-Saberi und Christ 2000).

Die Grenze zwischen diesen beiden Hälften ist durch längere, transversal gerichtete Zellen

gekennzeichnet. Dieser Spalt wird als „von Ebner's Fissur“ bezeichnet (Christ et al. 1975). Die beiden Hälften unterscheiden sich in der Zelldichte und den Proteinen, welche sie sezernieren. Die entstehenden Wirbel bestehen jeweils aus der kaudalen Hälfte eines und der kranialen Hälfte des nächsten kaudal liegenden Somiten (Huang et al. 1994; Huang et al. 1996; Christ et al. 2000; Huang et al. 2000).

1.4. Somitenumgebung

Jeder Somit ist von einer extrazellulären Matrix umgeben, über die er mit den umliegenden Strukturen verbunden ist (Solursh et al. 1979).

Die angrenzenden Strukturen sind: nach medial das Neuralrohr und die Chorda dorsalis, nach dorsal das Ektoderm, nach ventral das Endoderm und die Aorta und nach lateral der Wolffsche Gang. Außerdem ist der epitheliale Somit nach lateral über das intermediäre Mesoderm mit dem Seitenplattenmesoderm verbunden (Christ et al. 2004).

Nach rostral und kaudal ist jeder Somit mit seinem Nachbarsomiten über die extrazelluläre Matrix des intersomitischen Spalts verbunden (Christ und Ordahl 1995).

Die Entwicklung der Somiten erfolgt unter dem Einfluss von Signalen dieser Strukturen.

Die Zellen der epithelialen Somiten sind anfangs noch nicht auf ein Entwicklungsschicksal festgelegt. Dreht man experimentell die neu gebildeten Somiten, entwickeln sie sich entsprechend ihrer Position zu den umliegenden Strukturen (Aoyama und Asamoto 1988; Christ et al. 1992; Christ und Ordahl 1995).

1.5. *Pax1*- Expression und Sklerotomentwicklung

Die Expression des *Pax1*-Gens findet sich bereits in den ventromedialen Zellen der noch epithelialen Somiten (Deutsch et al. 1988; Ebensperger et al. 1995; Balling et al. 1996; Müller et al. 1996; Borycki et al. 1997). Im Hühnerembryo begleitet die *Pax1*-Expression die epithelio-mesenchymale Umwandlung (EMT) der ventralen Zellen zum Sklerotom. *Pax9* hingegen wird erst exprimiert, wenn das sklerotomale Mesenchym vollständig geformt ist (Müller et al. 1996).

Die Chorda dorsalis exprimiert während der Entstehung des Sklerotoms die Signale Sonic hedgehog (Shh) und Noggin, ein Bmp4 antagonist (Fan et al. 1995; Müller et al. 1996; McMahon et al. 1998).

In Shh knock-out Mäusen findet zwar eine *Pax1* Expression und auch eine Sklerotomentwicklung statt, das Sklerotom ist allerdings wesentlich kleiner und die *Pax1* Expression ist drastisch reduziert. Dies zeigt, dass Shh die Sklerotomentwicklung nicht iniiert sondern die Entwicklung begleitet. Es wird angenommen, dass beide Signale, Shh und Noggin während der Sklerotomentwicklung

zusammenspielen (Dockter 2000). Wird die Chorda dorsalis experimentell entfernt, kann keine *Pax1*- Expression im ventralen Teil des Somiten festgestellt werden (Ebensperger et al. 1995).

Die dorsalen und lateralen Zellen des Sklerotoms exprimieren kein *Pax1*. Diese werden über Bmp4 Signale gesteuert.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung wandern die Sklerotomzellen um die Chorda dorsalis und das Neuralrohr, im Brustbereich auch in das Seitenplattenmesoderm, und liefern das Anlagenmaterial für Wirbel, Meningen und Rippen (Christ et al. 2000).

1.6. *MyoD*- Expression, Dermomyotom- und Myotomentwicklung

Parallel zur Sklerotomentwicklung erfolgt die Dermomyotomentwicklung aus dem verbleibenden Somitenepithel, direkt unter dem Oberflächenektoderm. Gesteuert wird dies durch Signalmoleküle wie Wnt1 und Wnt3a, die vom dorsalen Neuralrohr abgegeben werden und Wnt4, Wnt6 und Wnt7a, die vom Oberflächenektoderm stammen (Spence et al. 1996; Dietrich et al. 1997; Fan et al. 1997).

Die erste molekulare Manifestation der Differenzierung zu Muskelzellen ist die Expression von MRFs (Muscle regulatory factor). Beim Hühnerembryo wird als erster MRF *MyoD* exprimiert, gefolgt von *Myf5*.

Mit Ausnahme eines Teils der Kopfmuskulatur, welche aus dem unsegmentierten kranialen und prächordalen Mesoderm entsteht, nimmt die ganze Skelettmuskulatur ihren Ursprung im Dermomyotom. Außerdem entstehen aus dem Dermomyotom Bindegewebe, Endothelien, Knorpel und Dermis (Christ et al. 2004).

Das Dermomyotom besteht zunächst aus epithelialen Zellen und wächst nach dorsomedial und ventrolateral. Es zeigt mit seiner Basalmembran in Richtung Ektoderm. Die Enden sind nach ventral gebogen. Das Dermomyotom besteht aus stark proliferativen Zellen, welche heterolog verteilt sind. In der medialen Lippe befinden sich die proliferativsten Zellen. 30 Stunden nach der Somitenbildung erfolgt eine epithelio-mesenchymale Umwandlung der medialen Zellen des Dermomyotoms (Gros et al. 2005).

Aus dem Zellen des Dermomyotoms wandern in zwei Schritten myotomale Vorläuferzellen aus. Zuerst wandern Zellen aus der dorsomedialen Lippe (DML) des Dermomyotoms unter dieses und breiten sich dann in zwei Richtungen aus. Im zweiten Schritt wandern erst Zellen aus der kaudalen- dann aus der kranialen Dermomyotomgrenze aus, zum Schluß auch aus der ventrolateralen Lippe (VLL)(Scaal und Christ 2004).

1.7. Unsegmentiertes Kopfmesoderm

Wie schon oben erwähnt, wird der größte Teil des paraxialen Mesoderms segmentiert und führt zur Bildung von Somiten.

Kranial der Ohrplakode jedoch befindet sich befindet sich das Kopfmesoderm, welches keine erkennbaren Somiten bildet. Dieses wird unterteilt in das präotische und weiter kranial in das prächordale Mesoderm (Hacker und Guthrie 1998).

Dieses unsegmentierte Kopfmesoderm stellt Material für Kopfmuskulatur zur Verfügung. Diese Kopfmuskulatur beinhaltet die äußere Augenmuskulatur, Kiefermuskulatur, mimische Muskulatur und kraniale Teile der Pharynxmuskulatur.

Obwohl das kraniale Mesoderm zeitlich gesehen vor dem somitischen Mesoderm aus dem Primitivstreifen entsteht, erfolgt die Differenzierung zur Muskulatur verglichen mit der des Rumpfes verspätet.

Im Vergleich zu den Somiten exprimiert das präotische Mesoderm kein Pax3 (Mootoosamy und Dietrich 2002).

Jedoch werden Mitglieder der *MyoD* Familie im Zuge der Differenzierung im präotischen Mesoderm exprimiert (Hacker und Guthrie 1998).

Transplantiert man kraniales paraxiales Mesoderm an die Position thorakaler Somiten entsteht hier keine Muskulatur. Dies zeigt, dass die Signale der axialen Strukturen, sowie des Oberflächenektoderms, welche die Myogenese der Somiten induzieren, diesen Effekt nicht bei kranialem paraxialem Mesoderm auslösen können. Ebenso können die Somiten die kranialen Signale nicht umsetzen. Dies deutet darauf hin, dass sich die Entstehung von Muskulatur aus unsegmentiertem Kopfmesoderm von der aus Somiten grundlegend unterscheidet (Mootoosamy und Dietrich 2002).

1.8. Der erste Somit

Der erste Somit entsteht wie alle anderen Somiten aus dem zunächst unsegmentierten paraxialen Mesoderm. Hamburger und Hamilton (Hamburger 1951; Hamilton 1952) stellten jedoch fest, dass der erste sichtbare Somit nicht der erste, sondern der spätere zweite Somit ist. Der erste Somit entsteht erst ein bis zwei Stunden danach.

Der erste Somit ist nach kranial unmittelbar mit dem Kopfmesoderm verbunden. Es besteht kein Spalt zwischen Kopfmesoderm und Somit. Im Vergleich dazu ist der zweite Somit nach kranial und kaudal durch einen deutlichen intersomitischen Spalt gekennzeichnet. Das erste intersomitische Blutgefäß befindet sich zwischen dem ersten und zweiten Somiten.

Der erste Somit liegt hinter der Ohrplakode, nahe der Herzanlage (Huang et al. 1997).

Hamilton und Hinsch (Hamilton und Hinsch 1956) stellten fest, dass der erste Somit des Hühnerembryos nur bis zum HH-Stadium 17, also bis zum dritten Tag vorhanden ist und dann verschwindet. Ein Grund hierfür könnte die fehlende Abgrenzung nach kranial sein.

Rex (Rex 1905) zeigte, dass der erste Somit einer Kompartimentierung in Sklerotom und Dermomyotom unterliegt und sich somit nicht von den anderen Somiten unterscheidet.

Das Sklerotom des ersten Somiten exprimiert *Pax1* (Ebensperger et al. 1995) und *Pax9* (Müller et al. 1996). Das Dermomyotom des ersten Somiten exprimiert *Pax3* (Dietrich et al. 1993; Goulding et al. 1993).

Die okzipitalen Somiten exprimieren die Gene *Hox-a1* und *Hox-b1*. Dies gilt auch für den ersten Somiten (Kessel und Gruss 1991).

Im Vergleich zu anderen Somiten ist das Sklerotom des ersten Somiten nicht in eine kraniale und kaudale Hälfte unterteilt (Huang et al. 1997).

Auf Grund der genannten Besonderheiten wird der erste Somit als rudimentärer oder unvollständiger Somit bezeichnet. Auf Grund seiner deutlichen kranialen und kaudalen Begrenzung wird der zweite Somit als erster vollständiger Somit bezeichnet. In den whole-mount Schnitten erscheint der erste Somit kleiner als der zweite. In einigen Fällen wurde im Stadium HH 9 (mit 6 Somiten) ein kleiner Zellhaufen kranial des ersten Somiten beobachtet. Dieser meist einseitig und kurzzeitig bestehende Zellhaufen wird als zweiter rudimentärer Somit bezeichnet (Jaeger 1926; Hamilton und Hinsch 1956).

Durch die Transplantation des ersten Somiten von Wachtelembrionen in Hühnerembryonen (Huang et al. 1997) wurden folgende Beobachtungen gemacht: nach der Kompartimentierung differenzieren sich die Zellen des ersten Somiten zum: Os basiokzipitale, Os exokzipitale, Os supraokzipitale und dem opisthotischen Anteil des Os petrosum (chondrale ossifikation), sowie zum Os parasphenoidale (desmale ossifikation).

Der kaudale Teil des Os supraokzipitale besteht hauptsächlich aus Zellen des ersten Somiten, der kraniale Teil aus Zellen des Kopfmesoderms.

Die Beobachtungen von Couly (Couly et al. 1993) zeigten, dass das Os parasphenoidale aus Zellen des Kopfmesoderms und der Neuralleiste gebildet wird. Huang (Huang et al. 1997) zeigte in Anlehnung daran, dass auch Zellen des ersten Somiten an der Bildung des Os parasphenoidale beteiligt sind.

Außerdem beobachteten sie, dass Chondrozyten, welche ihren Ursprung im ersten Somiten haben, sich direkt hinter der Cochlea in den opisthotischen Anteil des Os petrosum einlagern. Dies weist auf die enge Beziehung zwischen dem ersten Somiten und der Ohrplakode hin. So könnte sich erklären, dass das Rudiment des Ohres ein Wandern der Zellen des ersten Somiten nach kranial verhindert.

Außerdem tragen die Zellen des ersten Somiten zur Entstehung von Kopfmuskulatur wie dem *Musculus cucullaris capitis*, der Larynxmuskulatur, Zungenmuskulatur und diverser Nackenmuskeln bei (Couly et al. 1993).

Auch zu erwähnen ist der Beitrag der vom ersten Somiten stammenden Zellen zu den Meningen, dem Bindegewebe um den Pharynx, Blutgefäßen im Hinterhauptsbereich und den Meningen und der Haut im Kopfbereich.

Die unilateral transplantierten Zellen des ersten Somiten wandern nicht über die Mittellinie des Embryos (Huang et al. 1997).

Klessinger und Christ (Klessinger und Christ 1996) zeigten, dass das Neuralrohr eine Barrierefunktion für die Endothelzellen ausübt und somit ihr Wandern auf die kontralaterale Körperseite verhindert. Die Ergebnisse von Huang (Huang et al. 1997) bestätigten dies auch im Hinblick auf andere Zelltypen und bezogen auf die Somitenzellen der okzipitalen Region.

1.9. Derivate okzipitaler Somiten

Die Somiten eins bis fünf tragen zu Entstehung von Elementen am Schädel bei. Der erste und zweite Somit leisten ihren Beitrag zur Entstehung des Os parasphenoidale, welches durch direkte (desmale) Ossifikation entsteht. Aus dem zweiten Somiten entsteht ein Teil des Os basiokzipitale, des Os exokzipitale und des Os supraokzipitale. Die Somiten drei bis fünf tragen zur Entstehung der kaudal folgenden Teile des Os basi- und exokzipitale bei. Der fünfte Somit stellt die Grenze zwischen Kopf und Hals dar. Aus ihm entstehen sowohl der Condylus des Os okzipitale, als auch der kraniale Teil des Atlas und die Spitze des Dens axis. Diese Grenze kann durch In-situ-Hybridisierung mit dem Homöoboxgen *cHoxb3* sichtbar gemacht werden. Die Somiten eins bis vier eines 2 Tage alten Embryos exprimieren dieses Gen nicht, Expression tritt nur bei den nachfolgenden Somiten auf.

Der sechste Somit bildet den kaudalen Teil des Atlas und den kranialen Teil des Axis.

Die Somiten zwei bis acht bilden cranio-cervikale Muskulatur (*M.complexus*, *M.splenius capitis*, *M.rectus capitis dorsalis*, *lateralis* und *ventralis*) mit Ausnahme des *M. rectus capitis dorsalis* und *ventralis*, der keine Zellen des zweiten Somiten enthält. Der *M. cucullaris* wird nur von Zellen der Somiten eins und zwei gebildet (Huang et al. 2000).

1.10. Das kaudale Ende des Embryos

Wie schon oben erwähnt besitzen Vogelembryonen am Ende eines Segmentierungsprozesses meist 52 Somitenpaare. Jedoch kann diese Anzahl von 49- 53 Paare variieren (Sanders et al. 1986). Die

entgültige Anzahl der Somitenpaare ist im HH- Stadium 22 erreicht (Hamburger 1951). Hamburger und Hamilton beschrieben, dass die Somiten in diesem Stadium bis an das kaudale Ende des Schwanzes reichen und kein paraxiales Meoderm mehr vorhanden ist (Hamburger 1951; Hamilton 1952)

Neuere Studien belegen jedoch, dass zwar das Neuralrohr und die Chorda dorsalis bis an des hinterste Ende des Schwanzes reichen, das paraxiale Meoderm aber nie bis ganz an das kaudale Ende segmentiert wird (Bellairs und Sanders 1986).

1.11. Fragestellung und Vorgehensweise

Die Entwicklung der Somiten im Okzipital- und Zervikalbereich des Hühnerembryos ist bislang nur unzureichend dargestellt worden. In der vorliegenden Arbeit soll der zeitliche und räumliche Ablauf der Kompartimentierung der okzipitalen und zervikalen Somiten in die Kompartimente Sklerotom, Dermomyotom und Myotom systematisch beschrieben werden und so eine Grundlage für weitere experimentelle Arbeiten in dieser Region liefern. Die Dynamik der okzipitalen und zervikalen Somitenreifung wird anhand von Semidünnschnitten dargestellt und mit molekularen Markern bestätigt.

Die experimentelle Forschung an Somiten konzentriert sich, unter anderem auf Grund der Lagebeziehung zum Achsenskelett und der leichteren experimentellen Zugänglichkeit zum Großteil auf die thorakalen und lumbalen Somiten. Die in der Literatur gemachten Angaben über die Dynamik der Somitenreifung gelten in der Regel nur für die thorakalen und lumbalen Somiten.

Die neu geformten epithelialen Somiten entsprechen dort den Somitenstadien I-III und die kompartimentierten Somiten den Somitenstadien IV-X. Als vollständig kompartimentierte Somiten werden die Somiten ab dem Somitenstadium XI benannt (Christ und Ordahl 1995).

Es gibt jedoch Hinweise aus der Literatur, dass die Dynamik der Reifung und Kompartimentierung der okzipitalen und zervikalen Somiten von den Verhältnissen im Rumpf abweichen, dass sie stark verzögert und über mehrerer Segmente hinweg synchron ablaufen (Williams 1910). Beim Zebrafisch (*Danio rerio*) wird beobachtet, dass bei einem Embryo mit 7 Somiten alle Somiten epithelial sind. Danach verändern die ersten fünf Somiten auf einmal ihre Form (van Eeden et al. 1996).

Durch sagittale und transversale Schnittserien der okzipitalen und zervikalen Somiten, das heißt der Somiten 1-25, soll die Entwicklung dieser Somiten im Hühnerembryo umfassend morphologisch dargestellt werden.

Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung soll die Expression der Gene *Pax1*, als Marker für das Sklerotom und *MyoD*, als Marker für das Myotom dargestellt werden und die morphologischen Beobachtungen durch die molekularen Befunde ergänzt werden.

Bei Hühnerembryonen werden die Somiten wie folgt eingeteilt: 1-5 als okzipitale Somiten, 5-19 als zervikale Somiten, 19-26 als thorakale Somiten, 26-30 als lumbale Somiten, 30-39 als sakrale Somiten und 39-52 als kokzygeale Somiten (Christ und Ordahl 1995; Christ et al. 2000).

Die Somitenstadien werden nach der von Christ und Ordahl (Christ und Ordahl 1995) eingeführten Nomenklatur benannt. Demnach gibt es ein Nummerierungssystem mit arabischen und eines mit römischen Zahlen. Mit arabischen Zahlen werden die Somiten von kranial nach kaudal bezeichnet. Der kranialste, also der älteste Somit wird mit 1 bezeichnet, die nach kaudal folgenden Somiten mit aufsteigenden arabischen Zahlen. Mit römischen Zahlen werden die Somiten von kaudal nach kranial benannt um den individuellen Reifegrad der Somiten zu beschreiben. Der kaudalste, also der jüngste Somit wird mit I bezeichnet, die nach kranial folgenden Somiten mit aufsteigenden römischen Zahlen. Dieses System wird ergänzend zur Stadieneinteilung nach Hamburger und Hamilton (Hamburger 1951; Hamilton 1952) verwendet und gibt detailliertere Auskunft über das Entwicklungsstadium des Embryos. In meiner Arbeit verwende ich hauptsächlich die Nomenklatur mit römischen Zahlen von kaudal nach kranial um das Entwicklungsstadium der jeweiligen Somiten zu benennen.

Als Grundlage der Bestimmung der Embryonalstadien werden die Stadien der Embryonalentwicklung beim Huhn nach Hamburger und Hamilton (Hamburger 1951; Hamilton 1952) und die zugehörigen Inkubationszeiten benutzt:

Stadium	Inkubation	Hauptmerkmale
HH 7	23- 36 h	1 Somitenpaar (folgend je Paar gemeint)
HH 8	26- 29 h	4 Somiten, Blutinseln
HH 9	29- 33 h	7 Somiten, Augenbläschen
HH 10	33- 38 h	10 Somiten, 3 Hirnbläschen
HH 11	40- 45 h	13 Somiten, 5 Neuromere
HH 12	45- 49 h	16 Somiten, Kopf gerade, Ohrplakode
HH 13	48- 52 h	19 Somiten, Kopf leicht gedreht, Amnion bis Rhombenzephalon
HH 14	50- 53 h	22 Somiten, Kopf ganz gedreht, Hypophyse
HH 15	50- 55 h	24- 27 Somiten, spitzer Winkel zw. Tel.-und Dienzephalon

2. Material und Methoden

2.1. Tiere: Hühnerembryonen

Die befruchteten Hühnereier wurden vom Hühnerhof Bronner aus Freiburg-Tiengen bezogen. Es handelte sich um Eier von Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) der Rasse „weißer Italiener“.

Bis zur Verwendung wurden die Eier bei 15°C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden sie im Inkubator (Ehret; Emmendingen) bei einer Temperatur von 37,8°C und einer Luftfeuchtigkeit von 80% bis zum gewünschten Entwicklungsstadium bebrütet (25-55 Stunden).

2.2. Isolation und Einteilung in Stadien

Zuerst wurde Eiweiß mit Kanüle und Spritze aus dem Ei abgesaugt. Anschließend wurde die Eierschale mit einer Schere fenestriert. Dann wurde der Embryo erst grob mit einer Schere von den Eihäuten getrennt und zum Schluß unter dem Durchlichtmikroskop, je nach Entwicklungsstadium fast vollständig von Fruchthüllen befreit und die Somiten zur Einteilung gezählt.

Für diese Arbeit wurden die Embryonen in Stadien nach Hamburger und Hamilton (Hamburger 1951; Hamilton 1952) eingeteilt (im weiteren Verlauf genannt HH). Isoliert wurden die Stadien HH 7 bis HH 15.

Während der Isolation befanden sich die Embryonen in PBT-Lösung und wurden dann zur Aufbewahrung in 4% PfA / PBT- DEPC überführt.

2.3. Benennung der Somiten

Die Somitenstadien werden nach der von Christ und Ordahl eingeführten Nomenklatur benannt. Demnach gibt es ein System mit römischen und eines mit arabischen Zahlen. Mit römischen Zahlen werden die Somiten von kaudal nach kranial benannt. Der kaudalste, also der jüngste Somit wird mit I bezeichnet, die nach kranial folgenden Somiten mit aufsteigenden römischen Zahlen. Mit arabischen Zahlen werden die Somiten von kranial nach kaudal bezeichnet. Der kranialste, also der älteste Somit wird mit 1 bezeichnet, die nach kaudal folgenden Somiten mit aufsteigenden arabischen Zahlen (Christ und Ordahl 1995). Dieses System erleichtert die Benennung der Somiten wenn nur ein Teil der Somiten vorhanden ist. In meiner Arbeit verwende ich die Nomenklatur mit römischen Zahlen von kaudal nach kranial.

2.4. Einbetten in Kunstharz

Die Embryonen wurden aus der Fixierlösung genommen und 3 mal mit PBS-Lösung gespült. Anschließend wurde zu jeweils 2 Embryonen 1 Tropfen Osmium in das zuletzt verwendete PBS gegeben, kurz geschwenkt und dann weitere 3 mal mit PBS-Lösung gespült. Danach wurden die

Embryonen für folgende Zeiten in folgende Lösungen verbracht:

- 10 Minuten in 50%igen Alkohol
- 10 Minuten in 60%igen Alkohol
- 10 Minuten in 70%igen Alkohol
- 10 Minuten in 80%igen Alkohol
- 10 Minuten in 90%igen Alkohol
- 10 Minuten in 95%igen Alkohol
- 3 mal je 10 Minuten in 100%igen Alkohol
- 2 mal je 5 Minuten in Propylenoxid
- 1 Stunde in eine Mischung aus 2/3 Propylenoxid und 1/3 Kunstharz
- 1 Stunde in eine Mischung aus 1/3 Propylenoxid und 2/3 Kunstharz
- 2 Stunden in reines Kunstharz.

Nach den letzten 2 Stunden wurde das Kunstharz noch einmal erneuert. In diesem verblieben die Embryonen dann über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen unter dem Mikroskop in eine Einbettform in einzelne Blöcke in der gewünschten Richtung eingebettet. Nun wurde das Kunstharz mit den Embryonen darin 2-3 Tage bei 68°C im Ofen ausgehärtet.

2.5. Herstellung von Semidünnschnitten für die histologische Untersuchung

Aus den Embryonen in den Kunstharzblöcken wurden an einer Schneidemaschine mit Diamantmesser der Firma: Leica 0,75 µm dünne Schnitte hergestellt. In sagittaler Schnittrichtung wurde, bis der interessierende Abschnitt getroffen wurde, jeder 5. Schnitt aus der Wasserschale aufgenommen. In transversaler Schnittrichtung wurde jeder 10. Schnitt aufgenommen.

Die Schnitte wurden auf mit Alkohol gereinigte Objektträger aufgezogen und über einer Bunsenbrennerflamme fixiert.

2.6. Färbung und Deckelung der Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte wurden bei 100°C auf einer Heizplatte mit einer Färbelösung aus Metylenblau, Azur II, Natrium Tetraborat und Aqua dest. für ca. 10 sec. gefärbt.

Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Deckgläsern versehen, welche mittels Entellan fixiert wurden.

2.7. Whole-mount In-situ-Hybridisierung

Die whole-mount In-situ-Hybridisierung ermöglicht die Detektion von mRNA eines bestimmten Gens in einem kompletten Embryo.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, doppelsträngige Moleküle zu bilden, wenn die Nukleinsäureabfolge entsprechend 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. Durch eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion wird die Bindung des markierten Genstrangs (= Sonde) sichtbar gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sonden zur Darstellung der Expression von *Pax1* und *MyoD* verwendet. Die In-situ-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Nieto et al. (Nieto et al. 1996) durchgeführt. In der folgende Tabelle werden die Arbeitsschritte zusammengefasst:

Arbeitsschritte	Anzahl/Zeit	Temp.
I. Vorbehandlung der Embryonen		
Präparation der Embryonen in PBT 4°C		
Fixierung der Embryonen mit 4% PFA in PBT	über Nacht	4°C
Waschen in PBT	1x 15 min	4°C
Dehydrierung in 100% Methanol (Aufbewahrung in Methanol bei -20°C möglich)	2x 15 min	4°C
Rehydrierung in PBT	1x 15 min	4°C
Enzym-Verdau mit Proteinase K (20 µg/ml) in PBT	ca. 60 min	18°C
Waschen in PBT	1x 10 min	4°C
Fixierung in 0,25% Glutaraldehyd und 4% PFA in PBT	1x 20 min	4°C
Waschen in PBT	1x 10 min	4°C
Prähybridisieren in Hybridisierungspuffer	1x 2 h	65°C
In frischem Hybridisationdbuffer	über Nacht	65°C

II. Hybridisierung		
Hinzufügen der RNA-Sonde zum Hybridisierungspuffer	1x 2 d	65°C

III. Waschen		
Waschen in 2- fach SSC ohne CHAPS	1x 20 min	65°C
Waschen in 2- fach SSC mit CHAPS (CHAPS:SSC = 1:50)	2x 20 min	65°C
Waschen in 0,2fach SSC mit CHAPS (CHAPS:SSC = 1:50)	2x 20 min	65°C
Wechsel in KTBT	1x 5 min	18°C
IV. Immunhistochemischer Sonden-Nachweis		
Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10% Pferdeserum in KTBT	1x 4 h	18°C
Inkubation mit Antikörper-Lösung (anti-DIG)	über Nacht	4°C
Waschen in KTBT	6x 2 h	18°C
Waschen in KTBT	über Nacht	4°C
Waschen in AP-Puffer	2x 15 min	18°C
Inkubation mit der Färbe-Lösung (vor Licht geschützt)	nach Bedarf	18°C
Waschen in AP-Puffer	über Nacht	4°C
Refixierung in 4% PFA in PBS		

2.8. Herstellung von Vibratomschnitten zur histologische Untersuchung der in situ hybridisierten whole mounts

Die Embryonen wurden aus der Fixierung genommen und in 4%igen Agar („Agar Granulated“ von der Firma Becton Dickinson, USA) eingebettet.

Die Embryonen wurden mit dem Vibratom (Leica VT 1000S) vollständig von kaudal nach kranial in transversaler Schnittrichtung in 35µm dünne Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen.

2.9. Mikroskopie und Fotografie

Sowohl die Semidünnschnitte als auch die Vibratomschnitte wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Leica DMR) beurteilt.

Ausgesuchte Schnitte wurden am Durchlichtmikroskop mit einer Digitalkamera (Leica DFC 420) fotografiert. Die Bearbeitung der Fotos erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware „Adobe

Photoshop 7.0“.

2.10. Chemische Reagenzien und Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

2.10.1. Vorbehandlung und Einbetten in Kunstharz

PBS (pH: 7,2)

14,8 g Na_2HPO_4 + 4,3 g KH_2PO_4 + 72,0 g NaCl auf 1000 ml H_2O

Osmium (pH: 7,4)

1% Kaliumbichromat+1% Osmiumtetraxyd (Firma Plano) + 0,85% NaCl

Propylenoxid

von der Firma Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Kunstharz

8ml Durcupan rot + 12ml Durcupan blau + 0,3ml Durcupan gelb + 0,1ml Durcupan grün
zusammenschütten, rühren und anschließend im Kühlschrank aufbewahren.

rot: A/M Durcupan® ACM, Epoxydharz

blau: single component B

gelb: Beschleuniger 960

grün: Weichmacher

→ alles von der Firma Fluka Chemie AG, CH- Buchs

2.10.2. Färbelösung für Semidünnschnitte

1g Azur II + 1g Natrium Tetraborat in 100ml Aqua dest

2.10.3. Lösungen für die whole-mount In-situ-Hybridisierung

Paraformaldehyd (PFA) der Firma Sigma

10fach PBS-Stammlösung:

72 g NaCl; 4,3 g KH_2HPO_4 ; 14,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ auf 2000 ml mit Aqua bidest
auffüllen.

PBT:

0,1% Triton X-100 (Sigma) in PBS.

Proteinase K-Stammlösung:

20 mg/ml Proteinase K (Sigma) in PBT.

Glutaraldehyd-Stammlösung:

25 % Glutaraldehyd (Sigma)

Hybridisierungspuffer:

2% Blockierungspulver der Firma Boehringer

0,1% Triton X-100

0,1% CHAPS (Sigma)

1 mg/ml tRNA

5mM EDTA

50 µg/ml Heparin

in Formamid : 5fach SSC

1:1

20-fache SSC-Stammlösung:

3M NaCl und 0,3M Natrium-Citrat; pH 7.0

KTBT-Lösung:

50mM Tris-HCl, pH 7.5; 150mM NaCl; 10mM KCl, 1% Triton X-100

Antikörper-Lösung:

Anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer) und 10% Lamm-Serum in KTBT werden im Verhältnis 1:2000 verdünnt.

AP-Puffer:

5 ml 1M Tris-Puffer pH 9,5

2,5 ml 1M MgCl₂

1 ml 5M NaCl

2 ml Triton X-100

→ mit destilliertem Wasser

auf 50 ml auffüllen

Färbe-Lösung:

4,5 µl/ml NBT (Boehringer)

3,5 µl/ml BCIP (Boehringer)

→ in AP-Puffer

CHAPS-Lösung:

10 g Trockensubstanz in 100 ml Aqua bidest.

1 M Tris-Puffer-Stammlösung:

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

Pax1-Sonde:

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

MyoD Sonde:

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

BrdU-Lösung 40mmol:

0,01228 g/ml BrdU (Sigma) in Locke-Lösung

Serra-Fixierlösung 1l:

600 ml Ethanol, 300 ml Formol, 100 ml Eisessig

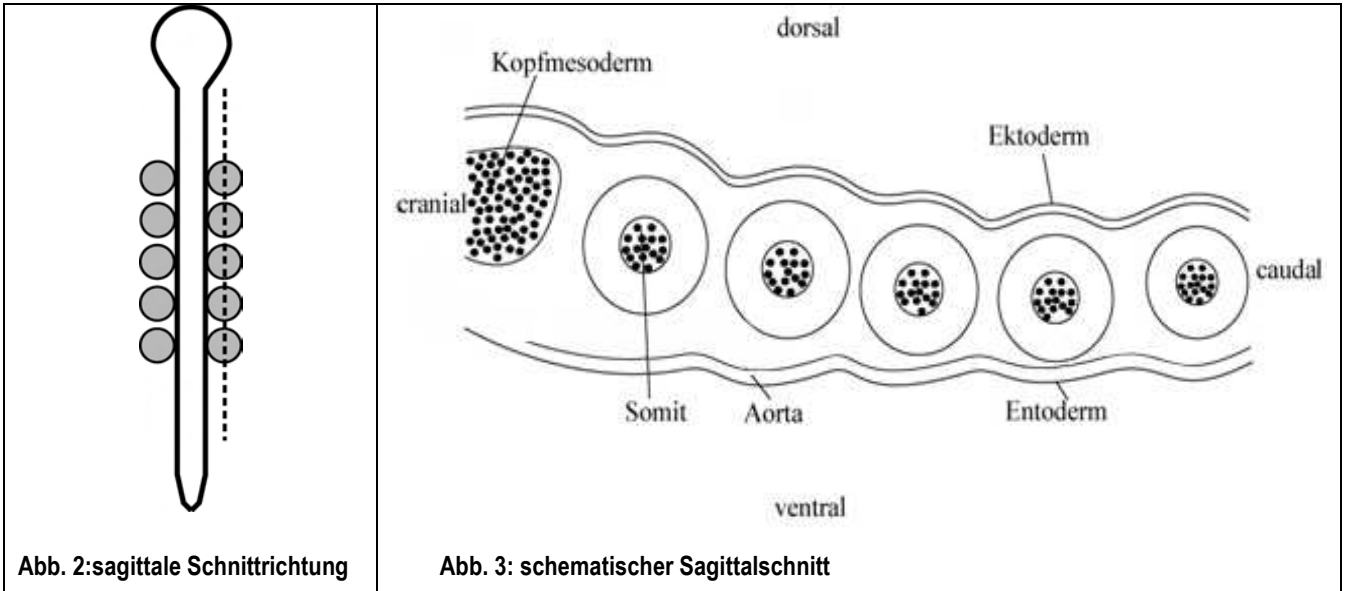
PBS-Tween:

500 µl Tween in 1000 ml PBS

3. Ergebnisse

3.1. Stadien mit epithelialen Somiten

Um einen Überblick über die Entwicklung der Somiten über mehrere Segmente zu gewinnen wurden die in Kunstharz eingebetteten Embryonen der HH-Stadien 7-15 zunächst sagittal 0,75µm dünn geschnitten.



Dabei wurde erkennbar, dass die Somiten bis zu einem Stadium von 9 Somiten in ihrer epithelialen Form persistieren. Das HH-Stadium 10, welches einer Somitenanzahl von 9-11 Somiten entspricht, ist somit als Übergangsstadium anzusehen. Dieses Stadium entspricht einem Embryonalalter von ca. 33- 38 Stunden.

Die folgenden Bilder zeigen die Stadien mit ausschließlich epithelialen Somiten:

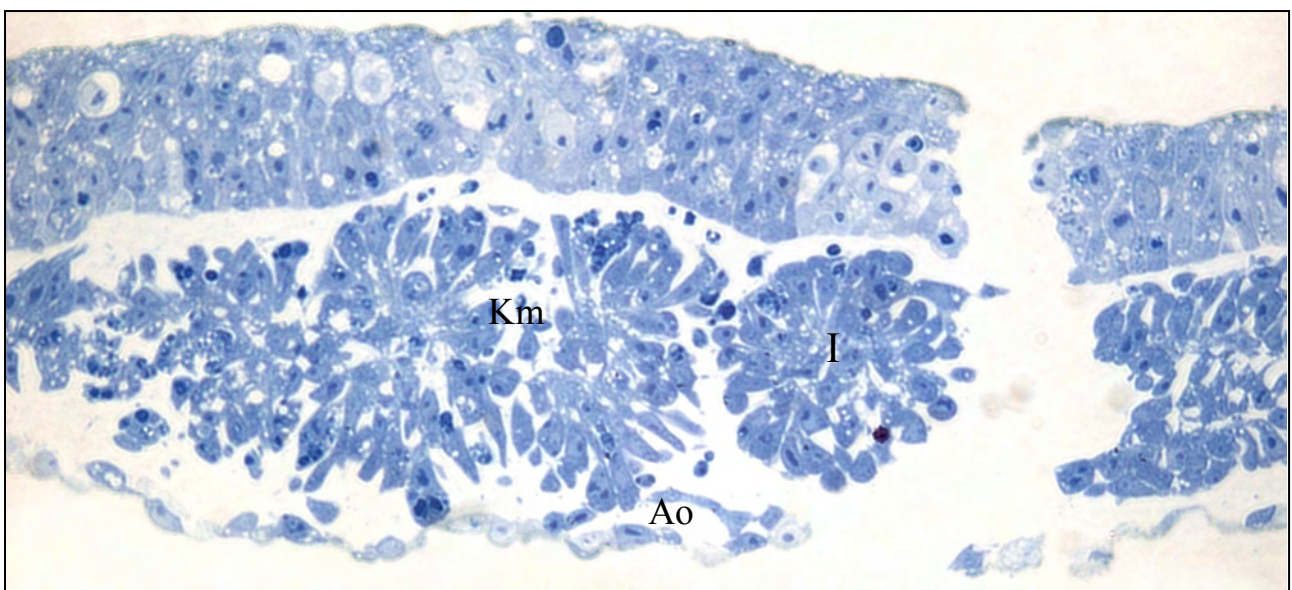


Abb. 4: HH 7 (1 Somit); Vergrößerung: 40-fach

I: I. Somit; Km: Kopfmesoderm; Ao: Aortenlumen (angeschnitten)

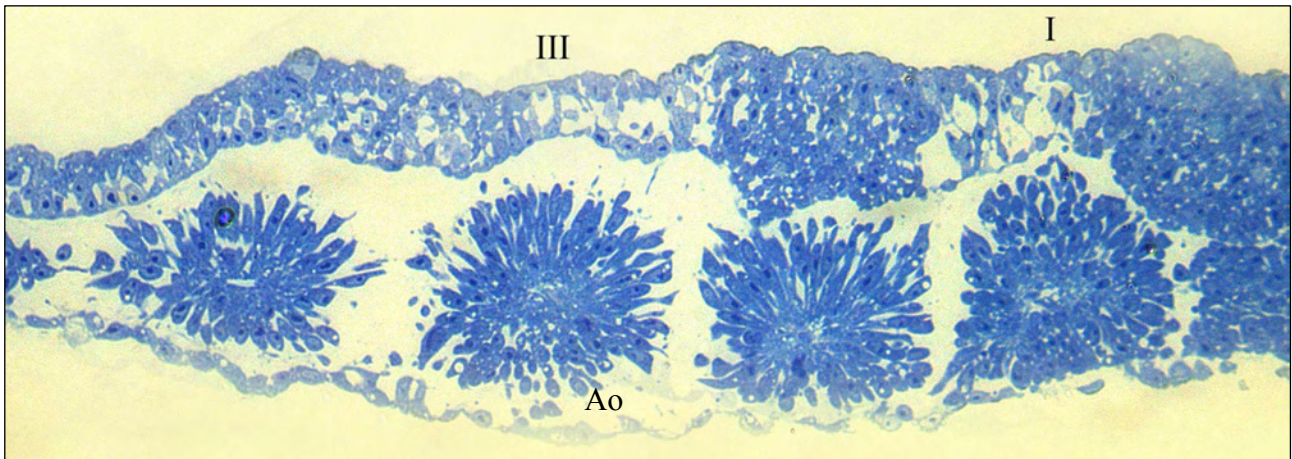


Abb. 5: HH 8 (4 Somiten); Vergrößerung:20-fach; Ao: Aortenlumen

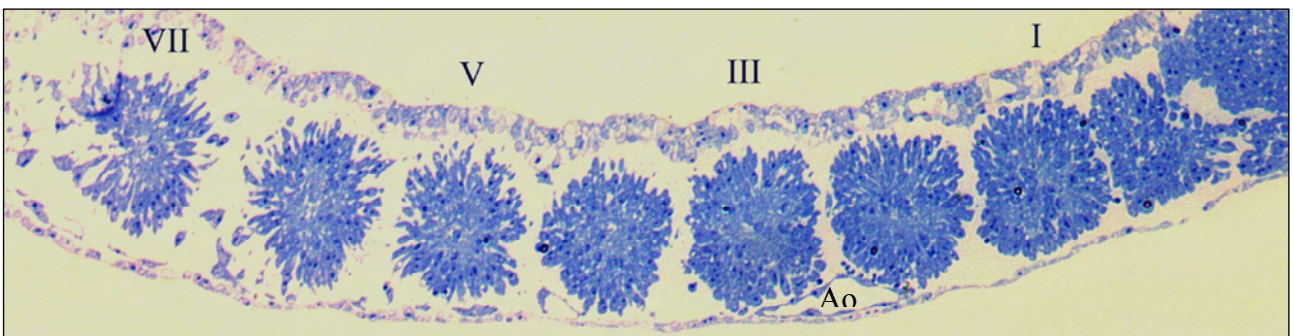


Abb. 6: HH 9 (7 Somiten; 8. Somit in statu nascendi); Vergrößerung: 10-fach; Ao: Aortenlumen

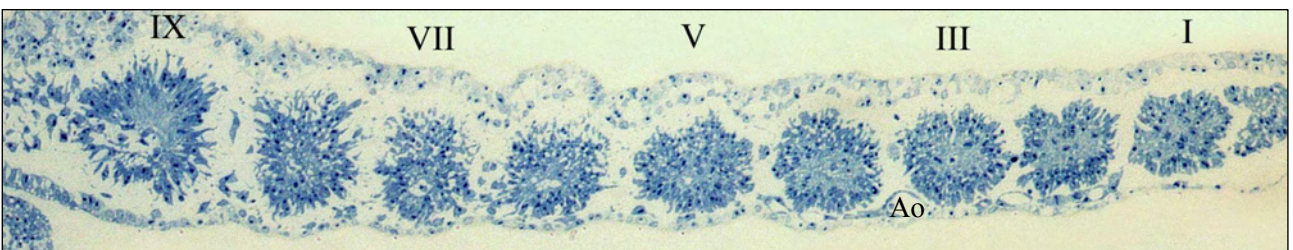


Abb. 7: HH 10 (9 Somiten); Vergrößerung: 10-fach; Ao: Aortenlumen

Zusätzlich zu den Sagittalschnitten wurden von den HH-Stadien 10 bis 15 Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 0,75µm in transversaler Schnittrichtung angefertigt, um die Morphologie der Somiten zu verdeutlichen. Die transversalen Schnitte bestätigen den epithelialen Charakter der Somiten 1-9 im Stadium HH 10 (siehe Abb.10).

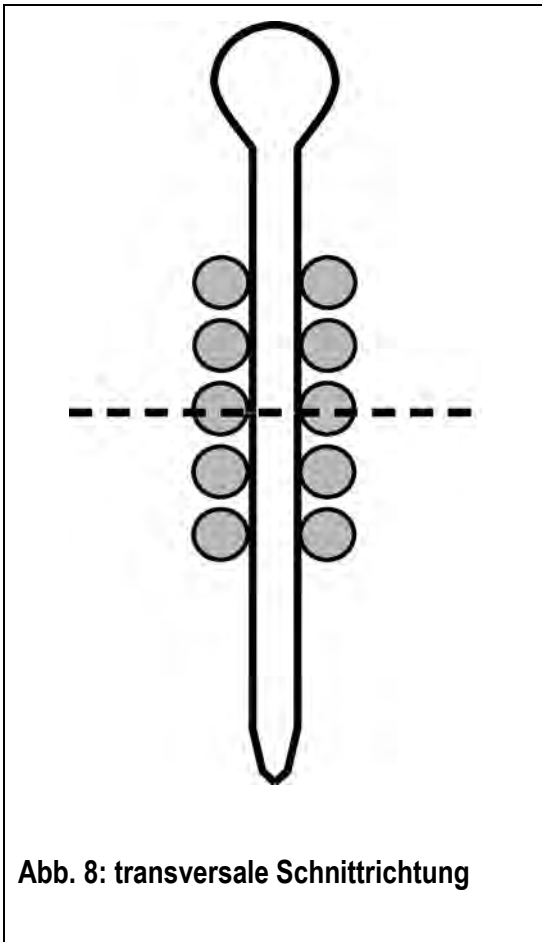


Abb. 8: transversale Schnittrichtung

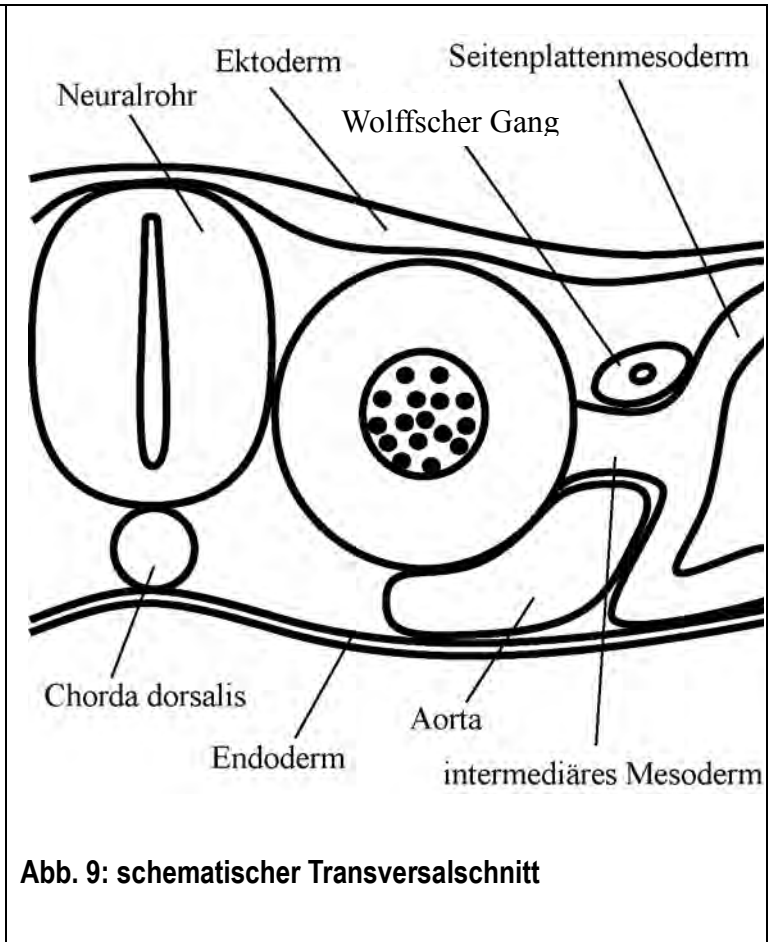


Abb. 9: schematischer Transversalschnitt

Stellvertretend für alle epithelialen Somiten hier das Bild des 1. Somiten eines Stadiums HH 10:



Abb. 10: HH 10, 1. Somit; Vergrößerung: 20 fach; Ao: Aorta

3.2. Stadien mit epithelio-mesenchymalem Übergang

Beginnend mit dem HH Stadium 10 konnten erste Anzeichen der Kompartimentierung festgestellt werden. Die ventralen Zellen des prospektiven Sklerotoms zeigen erste Anzeichen der Mesenchymalisierung, sichtbar als Lockerung des epithelialen Zellverbandes.

In einem Embryo mit 11 Somiten besitzen die Somiten I-VI, also die zuletzt gebildeten Somiten, epitheliale Struktur. Die Somiten VII bis X stellen einen Übergang dar. Das heißt, sie sind nicht mehr komplett epithelial, sondern zeigen eine beginnende Auflösung des Epithelverbandes in der ventralen Hälfte des Somiten. Erst im XI. Somiten ist eine vollständige Kompartimentierung in Dermomyotom und Sklerotom sichtbar. Als Kompartimentierung wird in diesem Entwicklungsabschnitt die deutliche Unterscheidung von epithelialelem Dermomyotom und mesenchymalem Sklerotom in einem Somiten definiert.

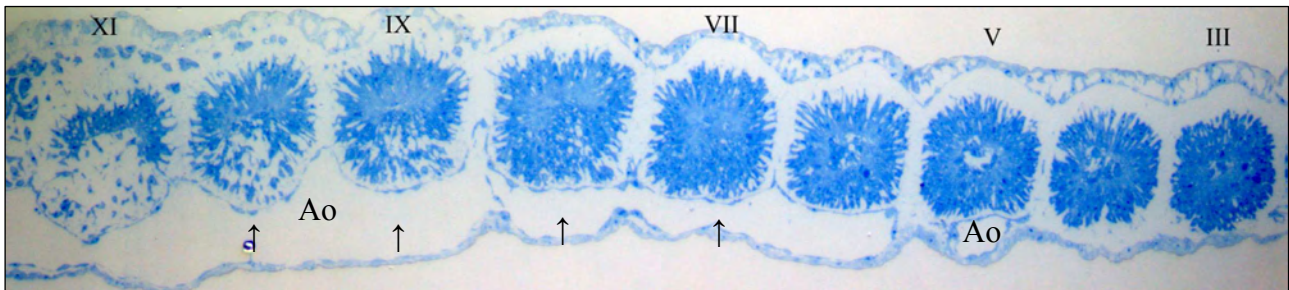


Abb. 11: HH 10, 11 Somiten (Ausschnitt: III.- XI. Somit); Vergrößerung: 10-fach; Ao: Aorta

↑:Somiten VII-X mit Auflösung des Epithelverbandes

Dies zeigt sich auch an den Transversalschnitten eines Embryos mit 12 Somiten (junges **HH 11** Stadium)

Am VIII. bis X. Somit lässt sich eine ventrale Auflockerung feststellen, was ein Übergangsstadium bestätigt.

Beim X. Somiten ist nur medial eine noch unvollständige Trennung zwischen Dermomyotom und Sklerotom zu sehen. Der XI. Somit erscheint vollständig kompartimentiert.

Die folgenden transversalen Schnitte dokumentieren den epithelio-mesenchymalen Übergang:

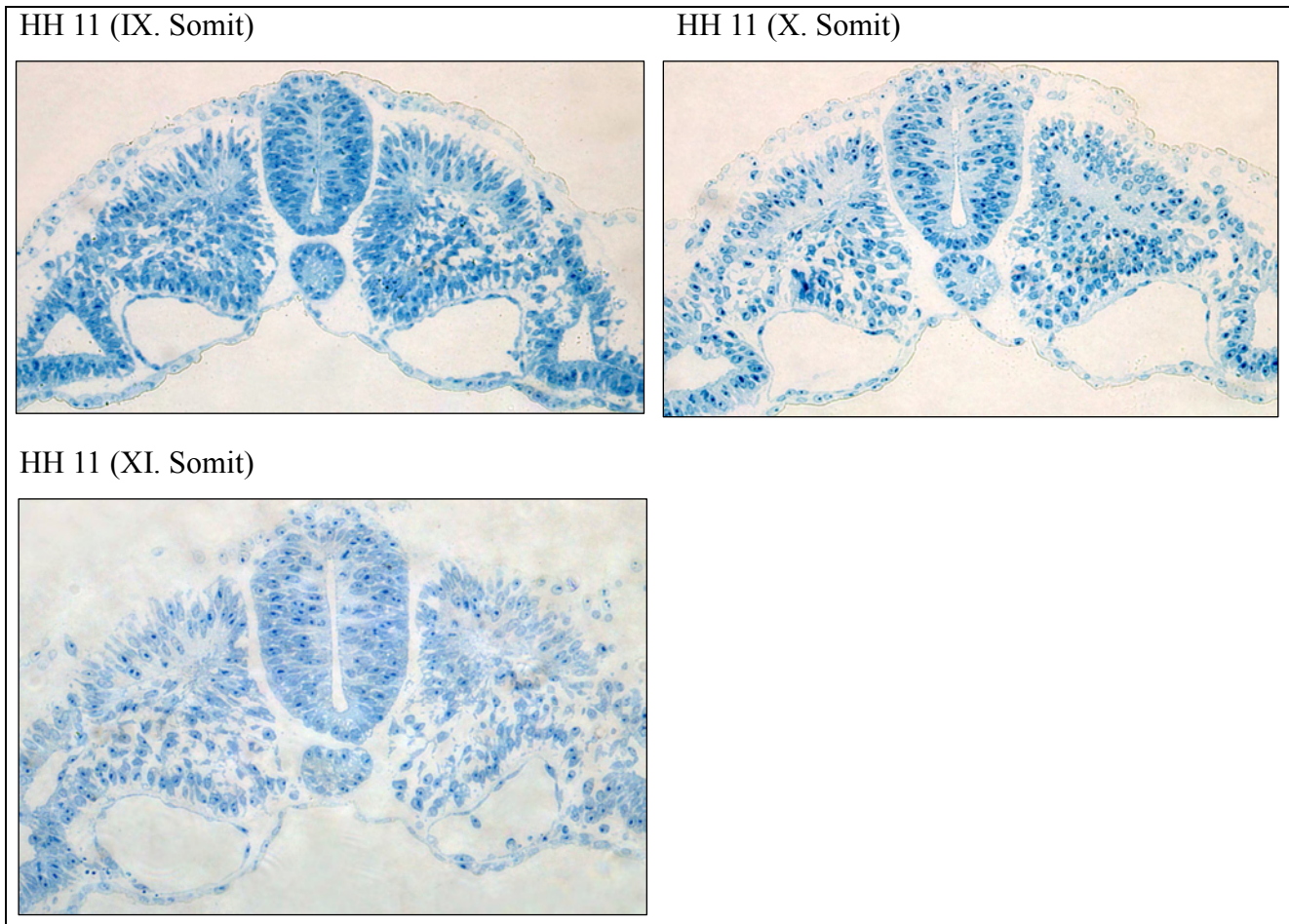


Abb. 12: Transversalschnitte des Stadiums HH-11, epithelio-mesenchymaler Übergang dargestellt an 3 Stellen eines von caudal nach cranial geschnittenen Embryos; Vergrößerung: 20-fach

Bei einem Embryo des Stadiums HH 11 mit 13 Somiten bleibt die Anzahl der epithelialen Somiten unverändert. Die Somiten I-VI erscheinen epithelial. Das Übergangsstadium, gekennzeichnet durch Auflösung des Epithelverbandes erstreckt sich auf die Somiten VII bis IX. Die Somiten X-XIII erscheinen vollständig kompartimentiert.

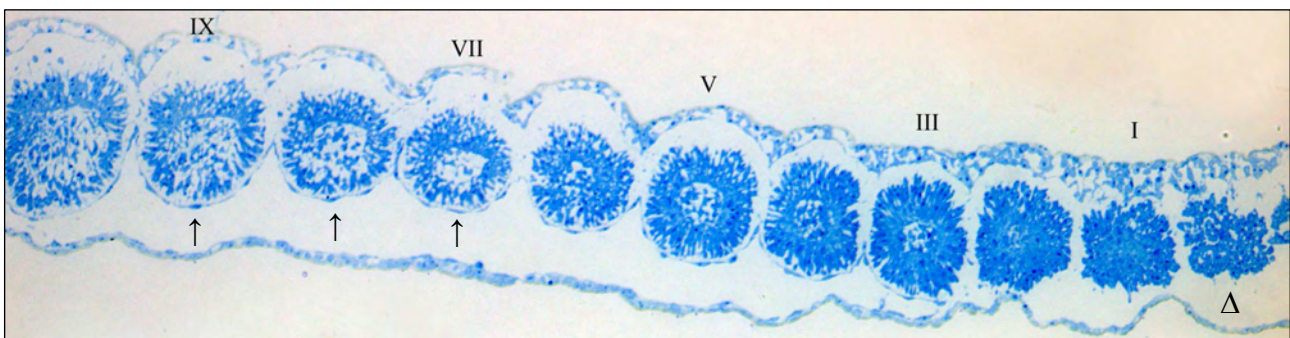


Abb. 13: HH 11 (13 Somiten, 14. in statu nascendi Δ) hier I.-X. Somit; Vergrößerung: 10-fach

↑: Somiten VII-IX mit Auflösung des Epithelverbandes

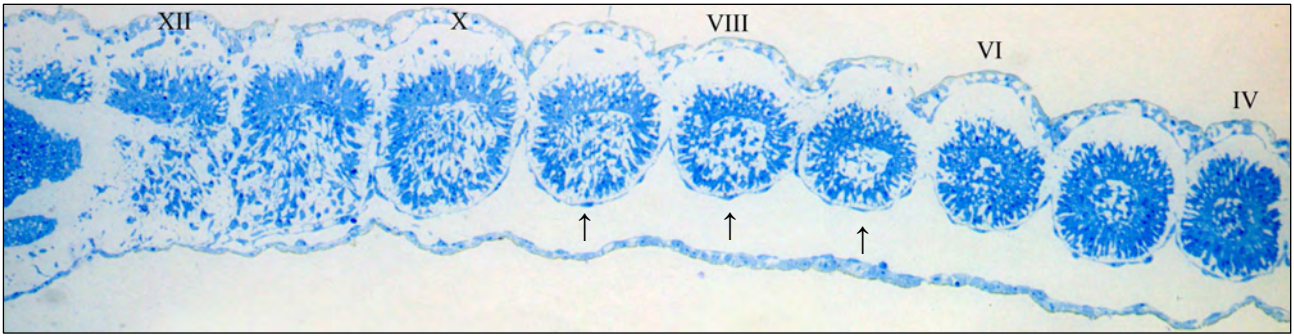


Abb. 14: HH 11 (13 Somiten) hier IV.-XIII. Somit; Vergrößerung: 10-fach

↑: Somiten VII-IX mit Auflösung des Epithelverbandes

Im Stadium **HH 12** mit 15 Somiten erscheinen ebenfalls die Somiten I-VI epithelial. Der VII. Somit erscheint deutlich aufgelockert. Am VIII. Somiten ist schon eine deutliche Kompartimentierung in Dermomyotom und Sklerotom erkennbar.

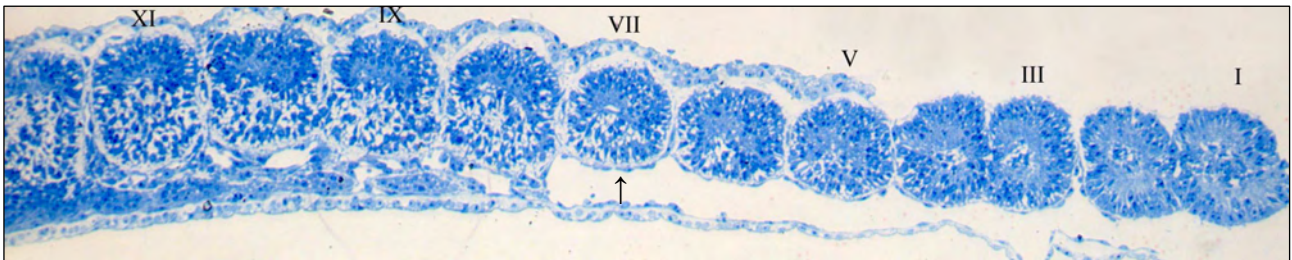


Abb. 15: HH 12 (15 Somiten) I.-XII. Somit ; Vergrößerung: 10-fach

↑: Somit VII mit aufgelöstem Epithelverband

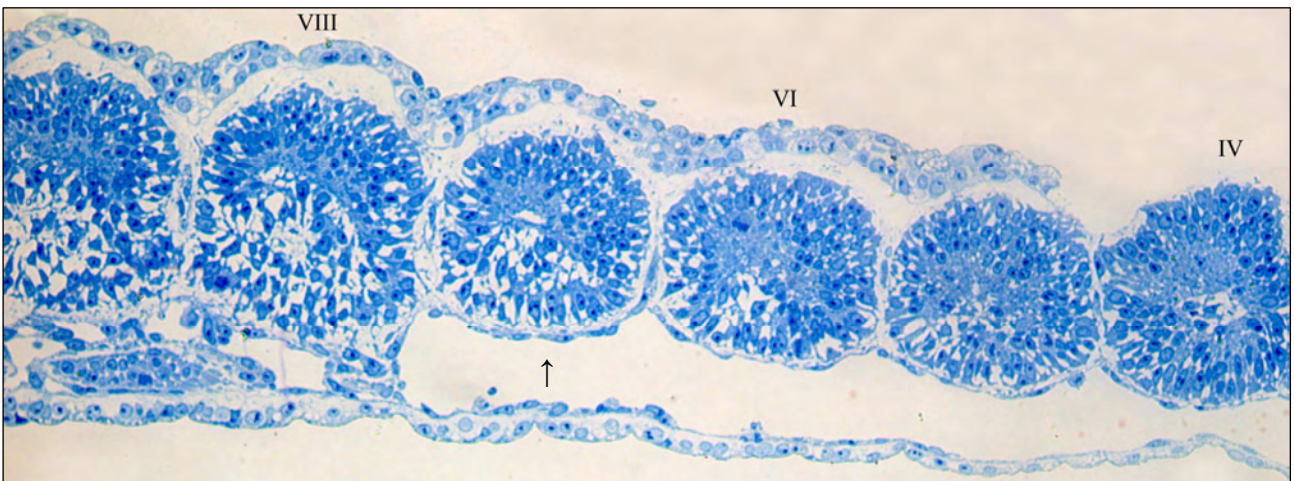


Abb. 16: HH 12 (15 Somiten) IV.- IX. Somit; Vergrößerung: 20-fach

↑: Somit VII mit aufgelöstem Epithelverband

Die Transversalschnitte des HH-Stadiums 12 zeigen den deutlich epithelialen Charakter des VI. Somiten, auch wenn schon eine Veränderung der Form des Somiten zu erkennen ist. Der VII. Somit zeigt eine beginnende Mesenchymalisierung.

Der VIII. Somit lässt dorsal das Dermomyotom und ventral das Sklerotom erkennen.

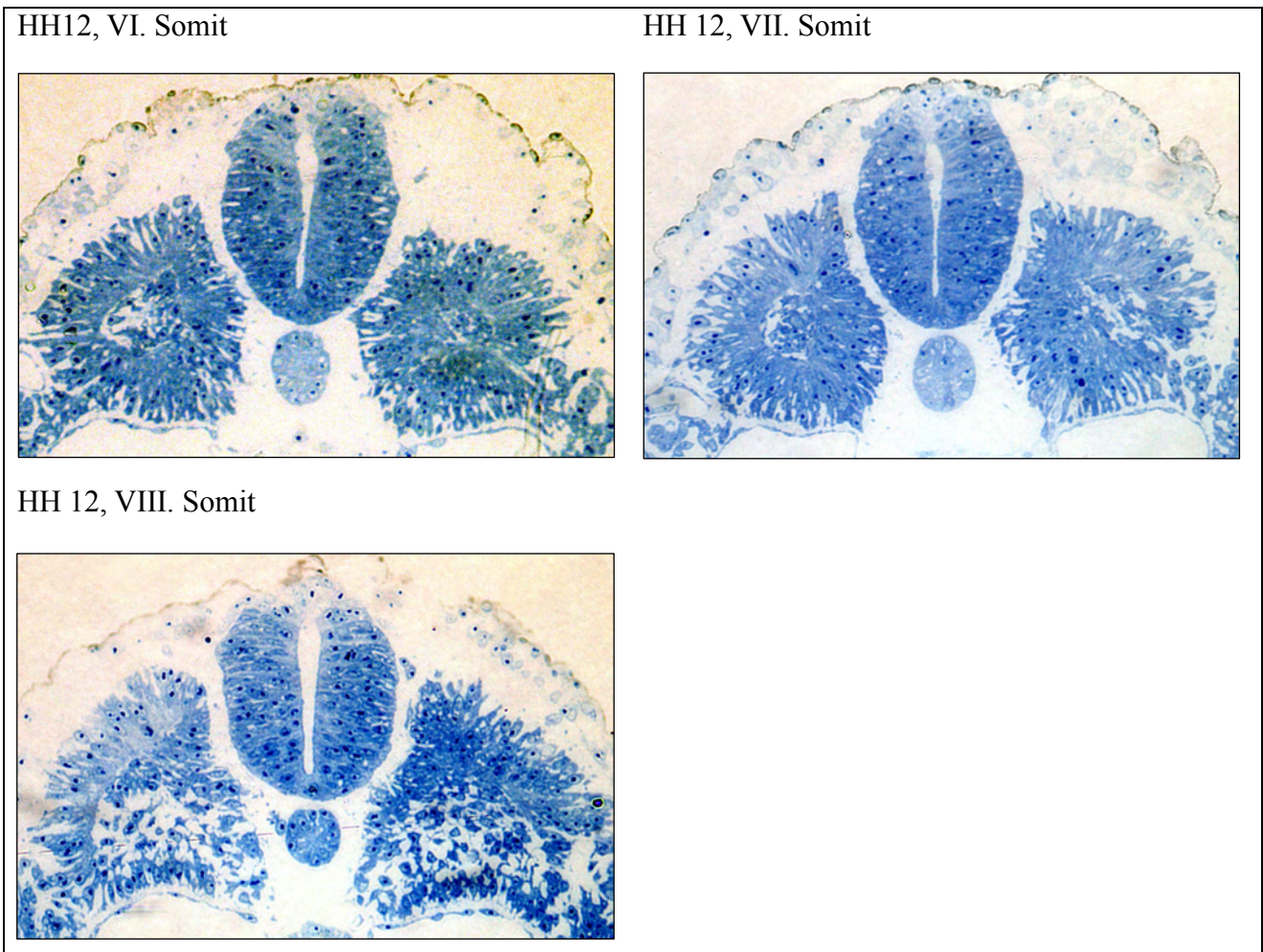


Abb. 17: Transversalschnitte des Stadiums HH 12; epithelio-mesenchymaler Übergang dargestellt an 3 Stellen eines von caudal nach cranial geschnittenen Embryos; Vergrößerung: 20-fach

Auch am Sagittalschnitt des Stadiums **HH 13** (18 Somiten) zeigen die Somiten I-VI weiterhin epithelialen Charakter. Die Somiten VII und VIII zeigen eine beginnende Mesenchymalisierung, ab dem IX. Somiten besteht eine Kompartimentierung.

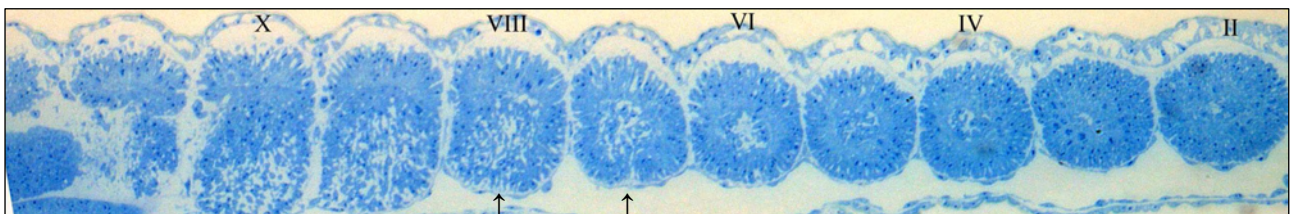


Abb. 18: HH 13 (18 Somiten) hier Somiten II-XII; Vergrößerung: 10-fach

↑: Somiten VII und VIII mit aufgelöstem Epithelverband

Die Transversalschnitte des HH Stadiums 13 zeigen ebenfalls einen epithelialen VI. Somiten mit leicht veränderter Form. Einen aufgelockerten VII. Somiten der noch eine Verbindung zwischen dorsalem und ventralem Anteil aufweist und einen bereits kompartimentierten VIII. Somiten.

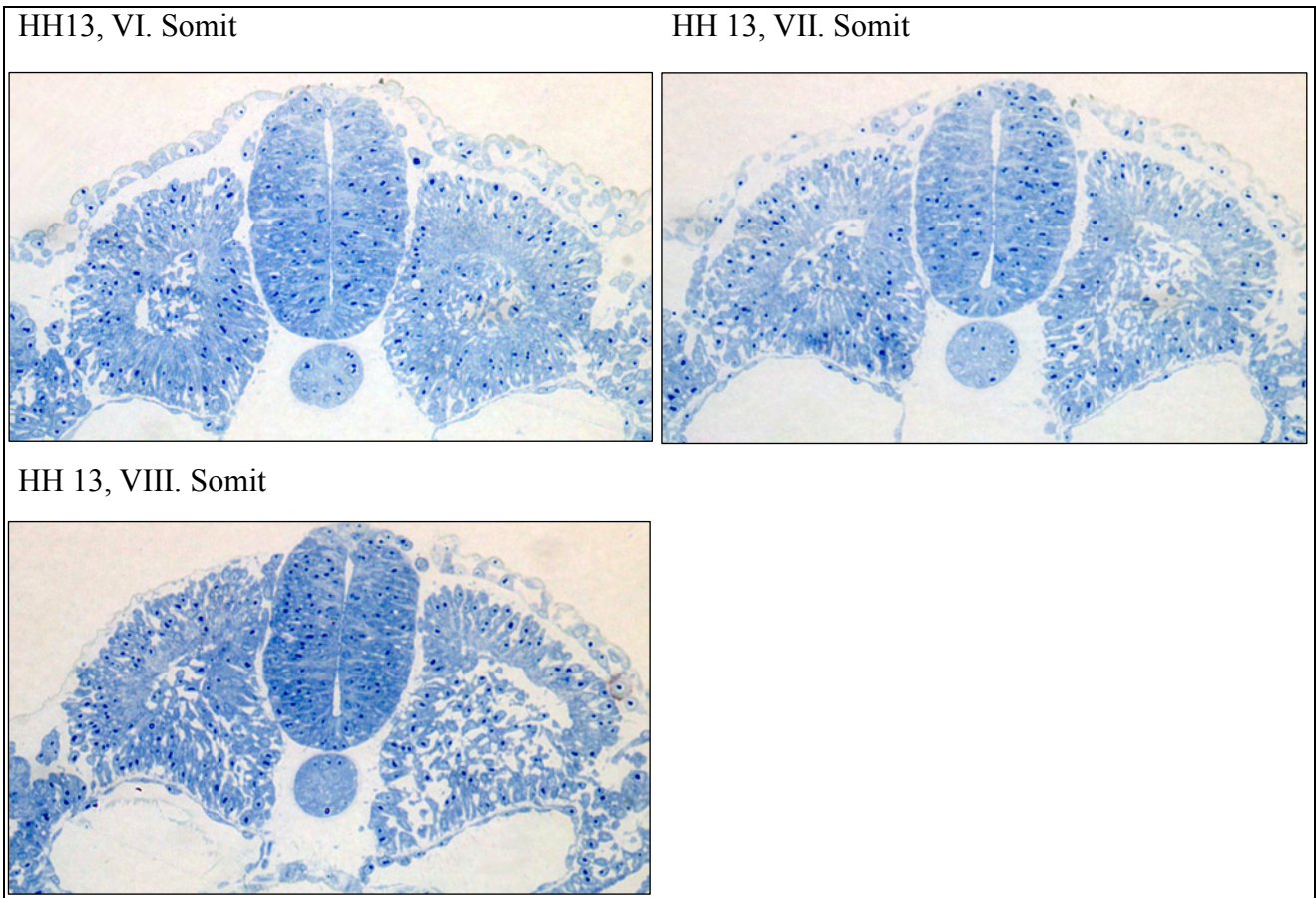


Abb. 19: Transversalschnitte des Stadiums HH 13, epithelio-mesenchymaler Übergang dargestellt an 3 Stellen eines von caudal nach cranial geschnittenen Embryos; Vergrößerung: 20-fach

Der Sagittalschnitt des Stadiums **HH 14** (21 Somiten) zeigt epithelialen Charakter der Somiten I-V. Der VI. erscheint aufgelockert, ab dem VII. Somiten besteht eine Kompartimentierung.

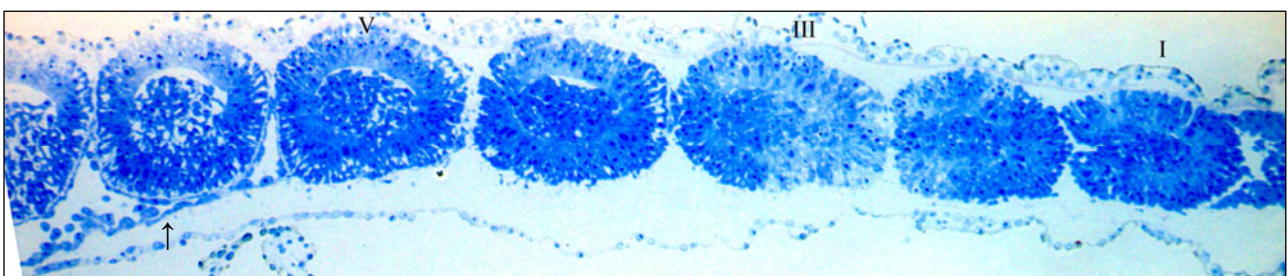


Abb. 20: HH 14 (21 Somiten) hier I.- VI. Somit; Vergrößerung: 10-fach

↑: Somit VI mit aufgelöstem Epithelverband

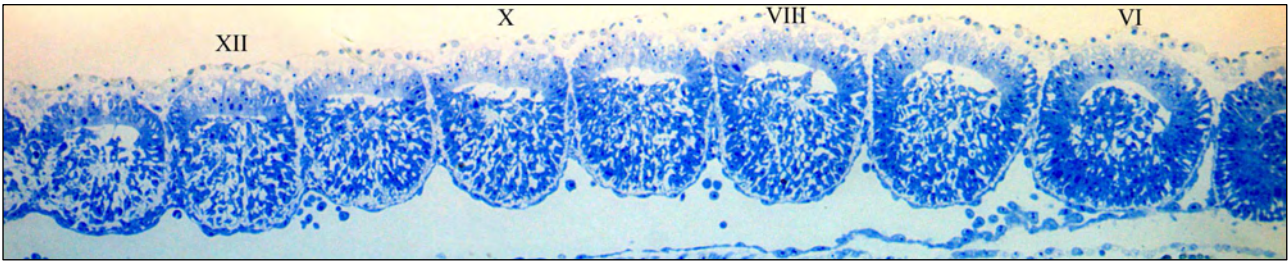


Abb. 21: HH 14 (21 Somiten) hier VI.-XIII. Somit; Vergrößerung: 10-fach



↑: Somit VI mit aufgelöstem Epithelverband

Anhand der Transversalschnitte des HH Stadiums 14 lässt sich eine Verringerung der epithelialen Somiten von VI auf V, wie sie sich auch in den Sagittalschnitten zeigt, bestätigen.

Der IV. Somit zeigt epithelialen Charakter, der V. Auflockerung, der VI. eine Kompartimentierung, jedoch noch mit medialer Verbindung, und der VII. Somit eine komplette Kompartimentierung.

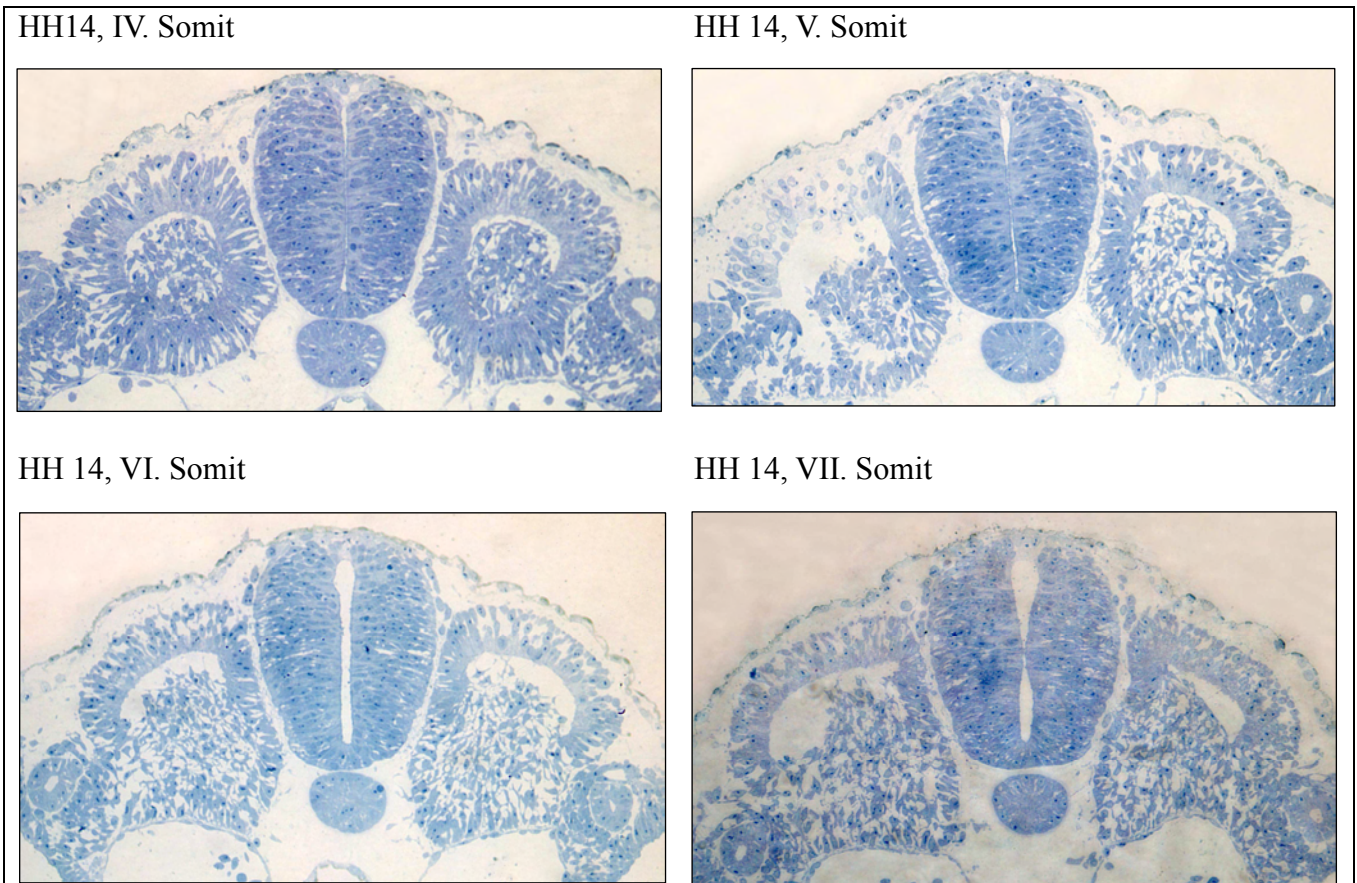


Abb. 22: Transversalschnitte des Stadiums HH 14, epithelio-mesenchymaler Übergang dargestellt an 4 Stellen eines von caudal nach cranial geschnittenen Embryos; Vergrößerung: 20-fach

Der Sagittalschnitt des Stadiums **HH 15** zeigt eine Reduzierung der epithelialen Somiten auf den I.-III. Somiten. Der IV. Somit erscheint aufgelockert, ab dem V. Somiten besteht eine Kompartimentierung.

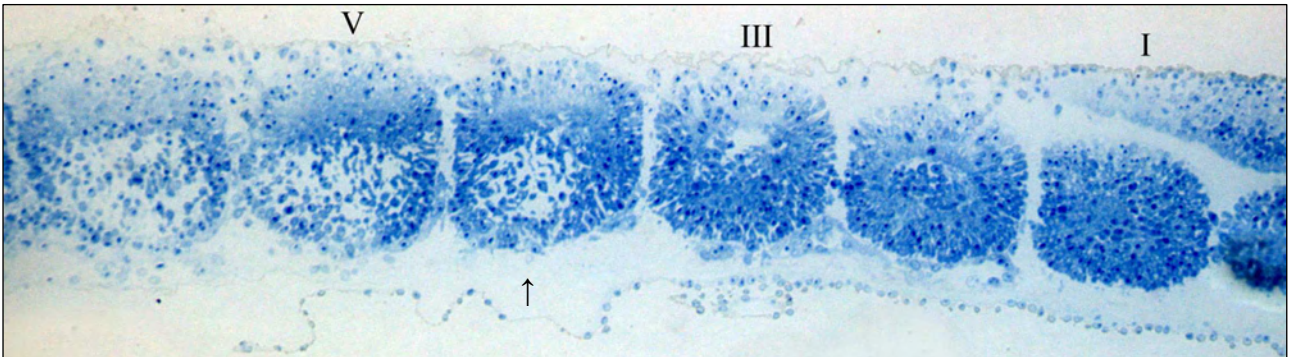


Abb. 23: HH 15: I.-VI. Somit; Vergrößerung: 10-fach

↑: Somit IV mit aufgelöstem Epithelverband

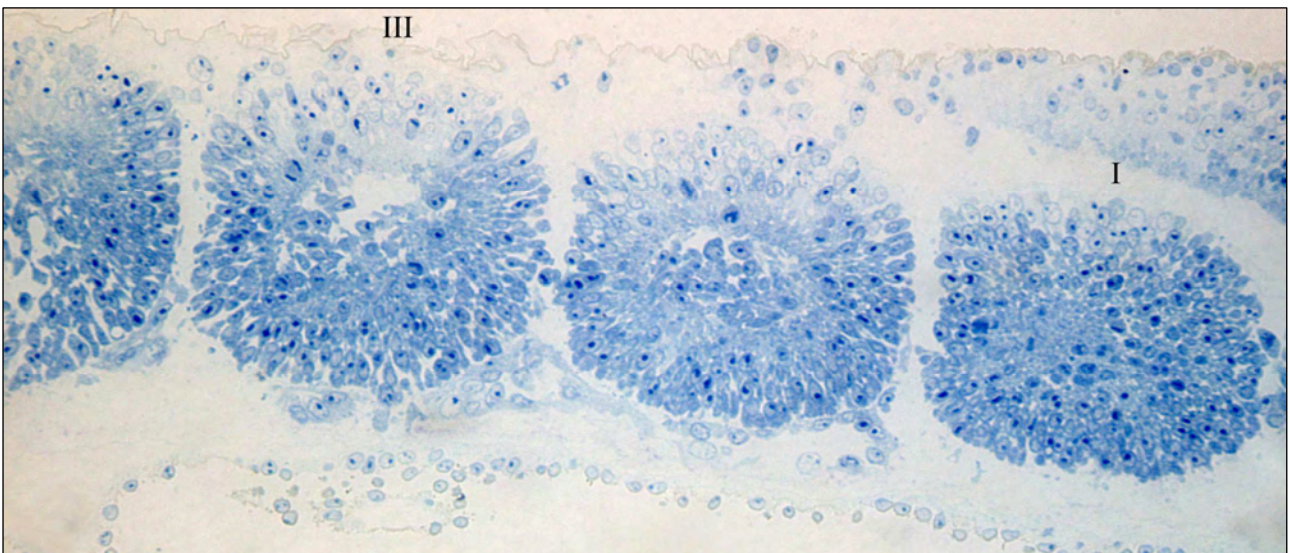


Abb. 24: HH 15: I.-III. Somit, IV. Somit halb; Vergrößerung: 20-fach

Die Transversalschnitte des HH Stadiums 15 bestätigen eine Beschränkung der epithelialen Somiten auf die Somiten I bis III.

Allerdings zeigt der III. Somit im Transversalschnitt schon eine beginnende Auflockerung der epithelialen Struktur. Der IV. Somit erscheint zwar medial epithelial, lässt aber schon eine deutliche Kompartimentierung erkennen.

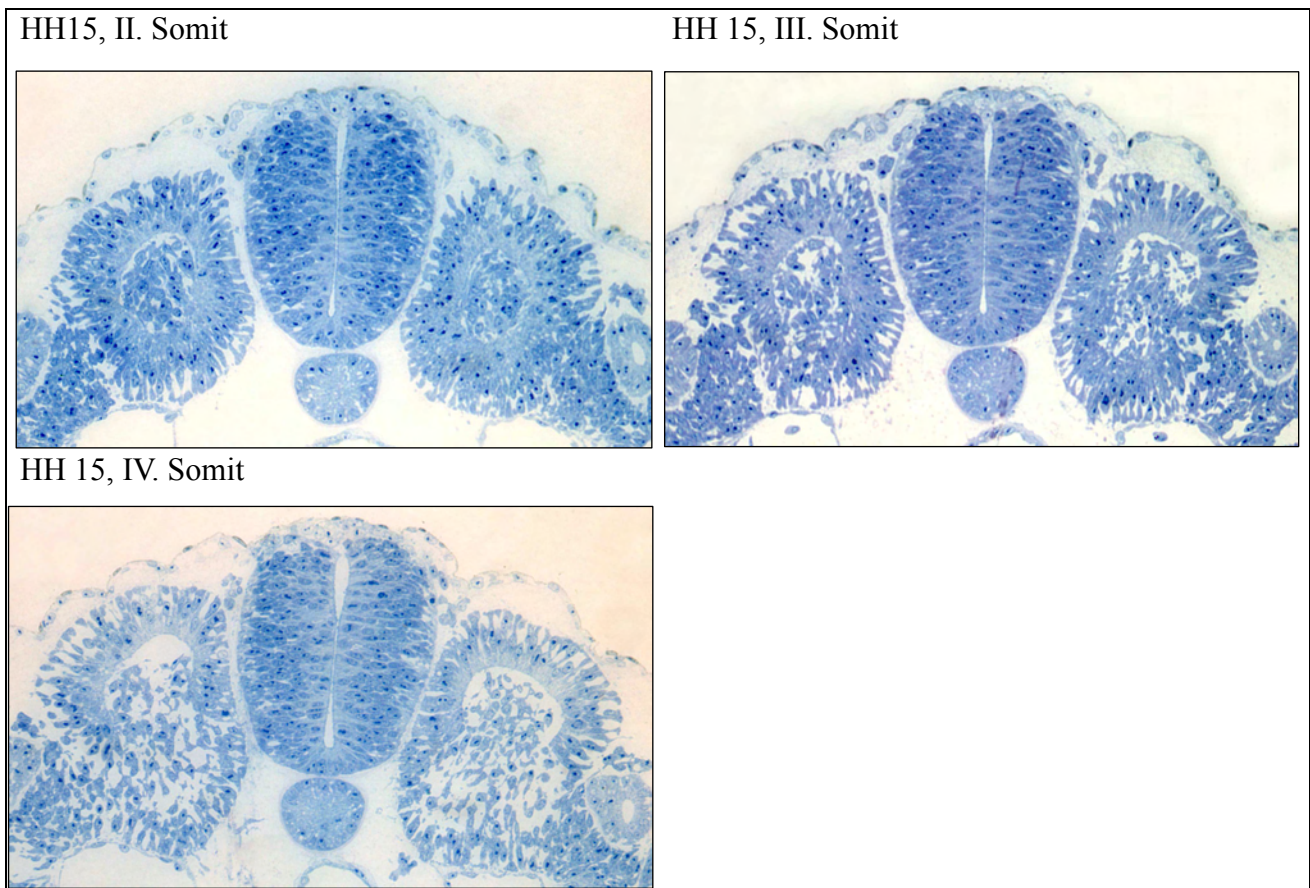


Abb. 25: Transversalschnitte des Stadiums HH 15; epithelio-mesenchymaler Übergang dargestellt an 3 Stellen eines von caudal nach cranial geschnittenen Embryos; Vergrößerung: 20-fach

3.3. In-situ-Hybridisierung

Neben der morphologischen Analyse lässt sich der Reifegrad eines Somiten anhand der Expression von Markergenen charakterisieren. Zur Markierung der sklerotomalen EMT (epithelio-mesenchymale Transition) wurden Embryonen der Stadien HH 7-HH 15 der In-situ-Hybridisierung mit dem sklerotomalen Transkriptionsfaktor *Pax1* unterzogen; zur Darstellung der myotomalen Differenzierung wurde der Transkriptionsfaktor *MyoD* verwendet.

3.3.1. *Pax1* (Sklerotom)

Bei der Betrachtung der whole mounts der mit *Pax1* hybridisierten Embryonen wurde in den Stadien HH 7-HH 9 keine Genexpression beobachtet. Das Stadium **HH 10** bestätigt sich als Übergangsstadium. Allerdings zeigt sich die Genexpression schon bei einem Embryo mit 9 Somiten, nicht erst bei einem mit 11 Somiten, wie nach den Semidünnschnitten zu vermuten gewesen wäre. Folgendes Bild zeigt ein HH-Stadium 10 mit 9 Somiten von denen I-IV keine Expression aufweisen, die Somiten V-IX deutlich *Pax1* exprimieren.

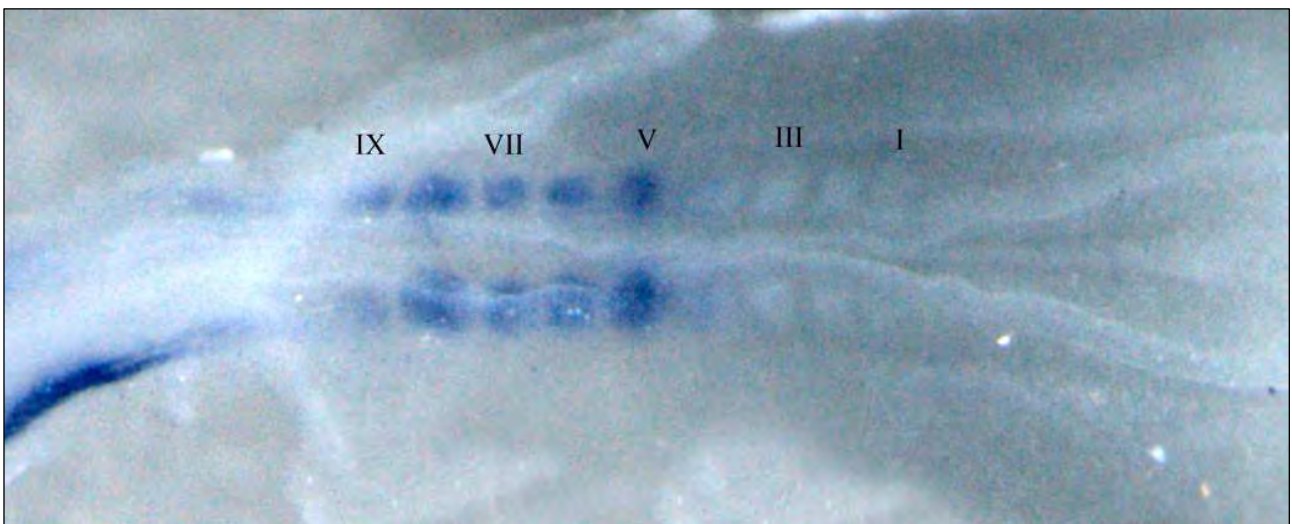


Abb. 26: HH 10, 9 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Beim Stadium HH 10 mit 11 Somiten zeigen sich der I.-V. Somit ohne Expression. Die Somiten VI-XI exprimieren Pax1.

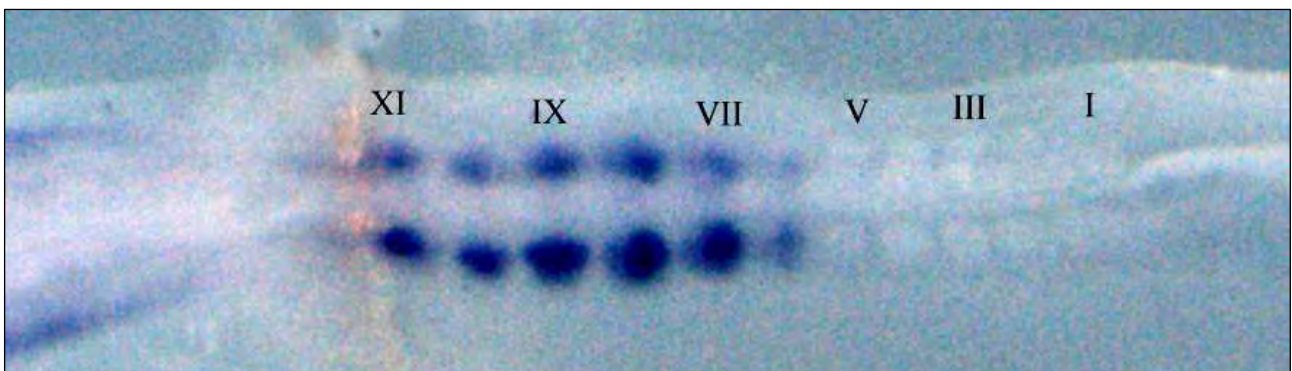


Abb. 27: HH10, 11 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Die 35µm dünnen, transversalen Vibratonschnitte dieses Embryos zeigen, dass die Expression des VI. und VII. Somiten in einem vollständig epithelialen Somiten vorliegt. Erst ab dem VIII. Somiten ist die Expression in einem kompartimentierten Somiten sichtbar.

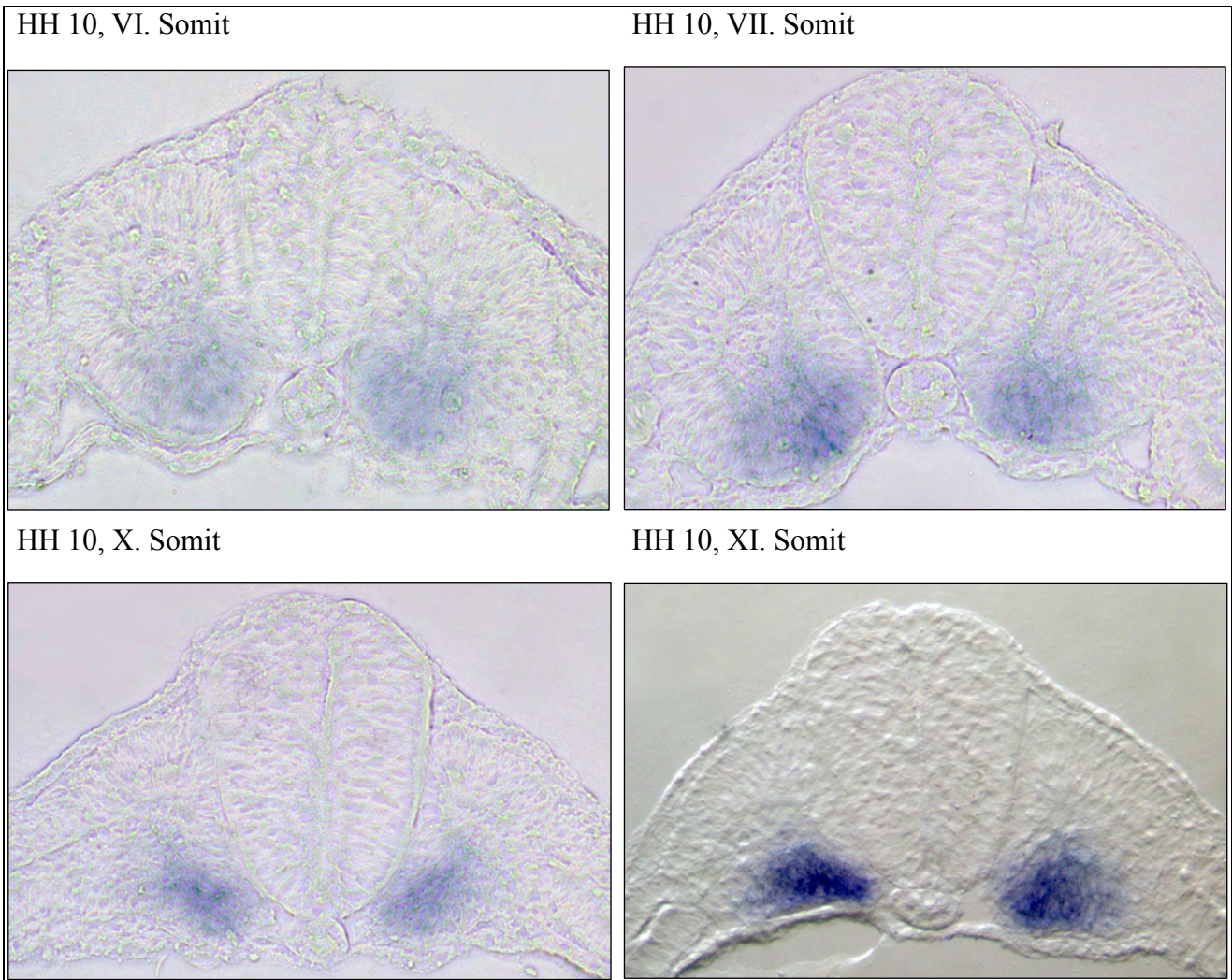


Abb. 28: Transversalschnitte des Stadiums HH 10, In-situ-Hybridisierung, *Pax1*; Vergrößerung: 20-fach

Das Stadium **HH 11** zeigt keine Expression an den Somiten I-VI der VII. Somit weist eine schwache Expression auf, die Somiten VIII-XIII sind eindeutig gefärbt.

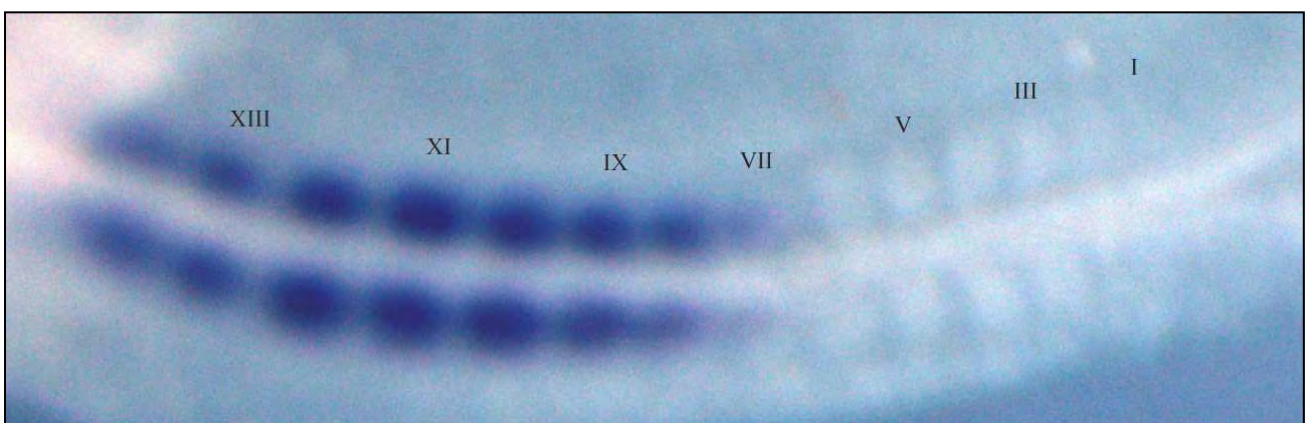


Abb. 29: HH 11, 14 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Die Vibratomschnitte bestätigen die Expression, welche auf den whole mounts zu sehen ist. Der VIII. Somit weist trotz Expression noch eine epitheliale Struktur auf, was für ein Übergangsstadium spricht.

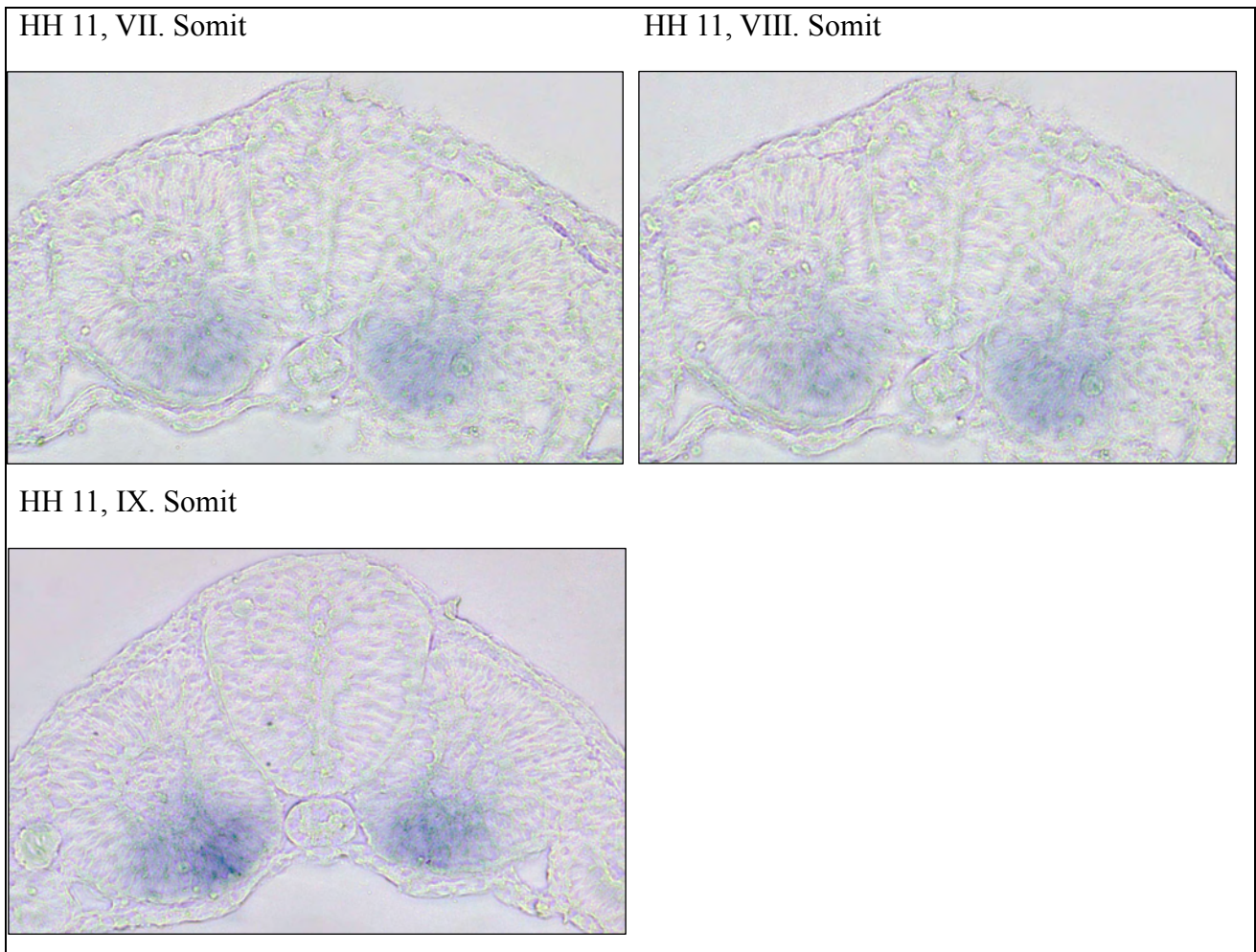


Abb. 30: Transversalschnitte des Stadiums HH 11, In-situ-Hybridisierung, *Pax1*; Vergrößerung: 20 fach

Am whole mount des Stadiums **HH 12** mit 16 Somiten, sieht man an den Somiten I-VI keine Expression, die Somiten VII und VIII erscheinen leicht gefärbt und die Somiten IX-XVI deutlich gefärbt.

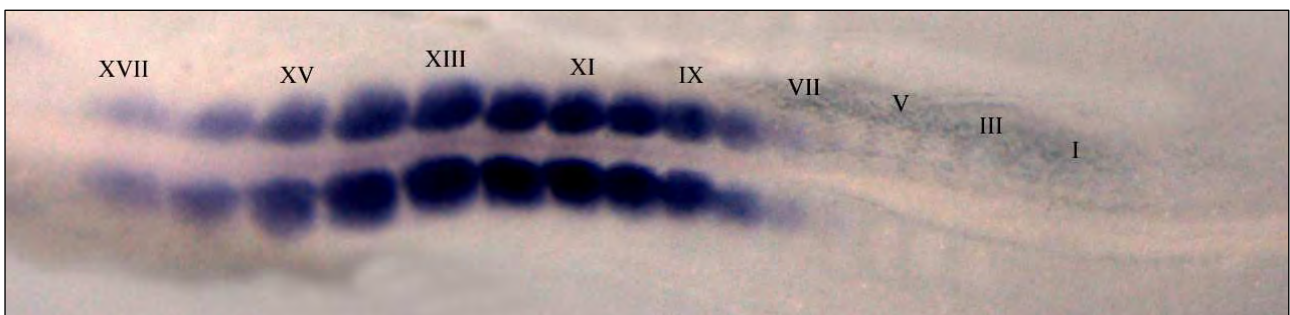


Abb. 31: HH 12, 16 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Auch in den Vibratomschnitten ist sichtbar, dass die Expression im VII. und VIII. Somiten, die sich am whole mount schwach gezeigt hat, eine Expression im noch nicht vollständig kompartimentierten Somiten darstellt. Das Epithel des Somiten ist hier noch über die gesamte Oberfläche geschlossen. Also sind diese Stadien als Übergangsstadien anzusehen. Der IX. Somit zeigt eine Expression im morphologisch kompartimentierten Somiten.

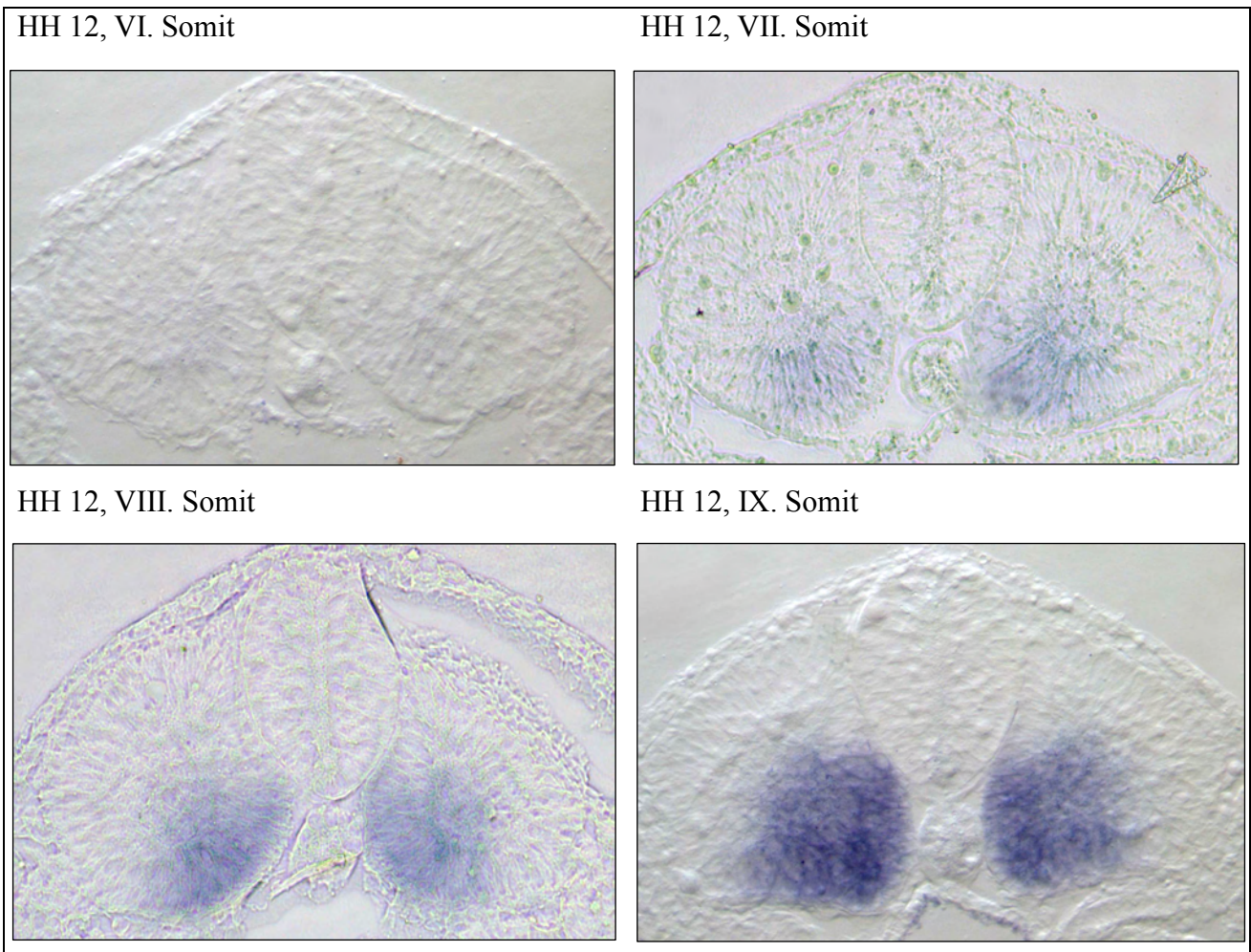


Abb. 32: Transversalschnitte des Stadiums HH 12, In-situ-Hybridisierung, *Pax1*; Vergrößerung: 20-fach

Im Stadium **HH 13** zeigen sich die Somiten I-VII ohne Expression, die Somiten VIII und IX mit leichter und X-XVIII mit deutlicher Expression.

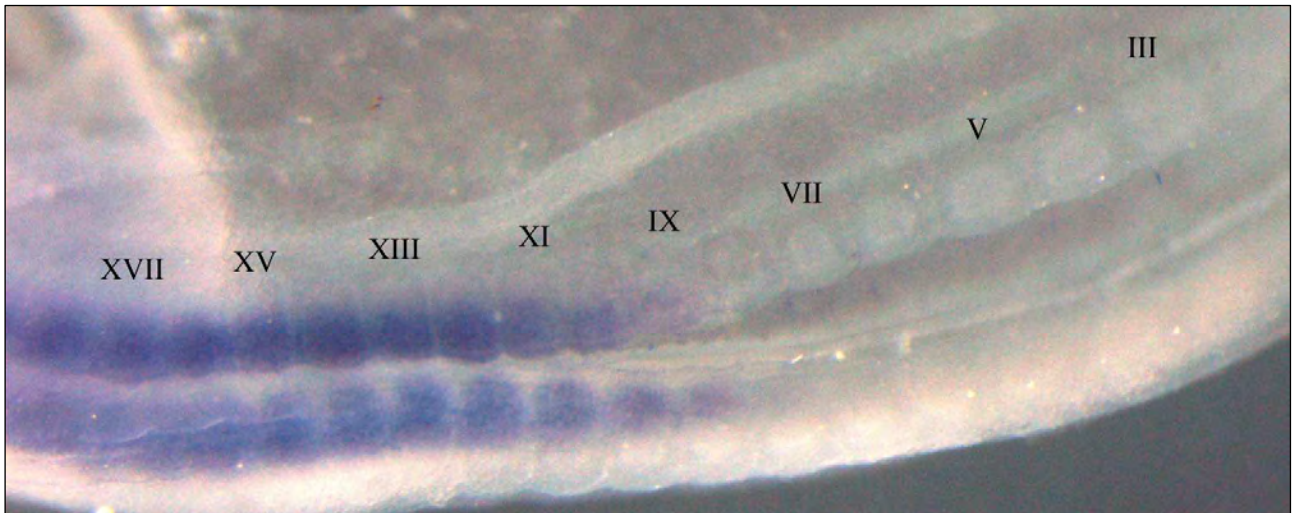


Abb. 33: HH 13, 18 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

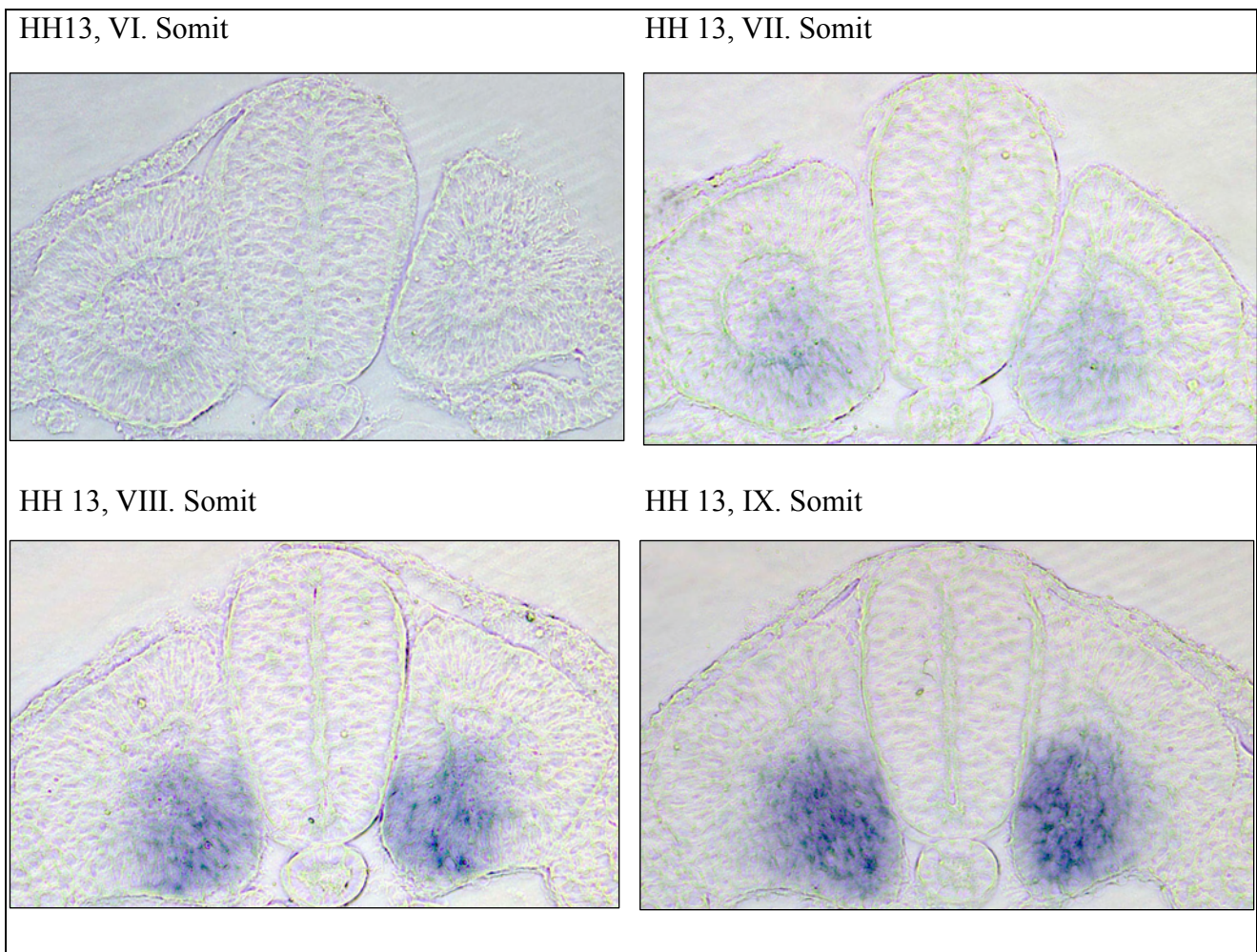


Abb. 34: Transversalschnitte des Stadiums HH 13, In-situ-Hybridisierung, Pax1; Vergrößerung: 20-fach

Das Stadium **HH 14** mit 22 Somiten zeigt die Somiten I-III ohne Expression, den IV. mit schwacher und ab dem V. Somiten deutliche Expression

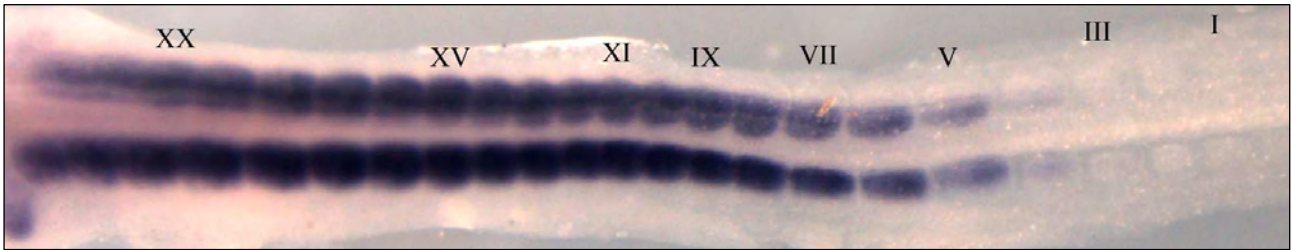


Abb. 35: HH 14, 22 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Zur Bestätigung der whole mounts zeigen die Vibratonschnitte am III. Somiten eine kaum sichtbare Expression, am IV. eine deutliche Expression jedoch mit epithelialem Charakter des Somiten, und am V. Somiten eine Expression am deutlich kompartimentierten Somiten.

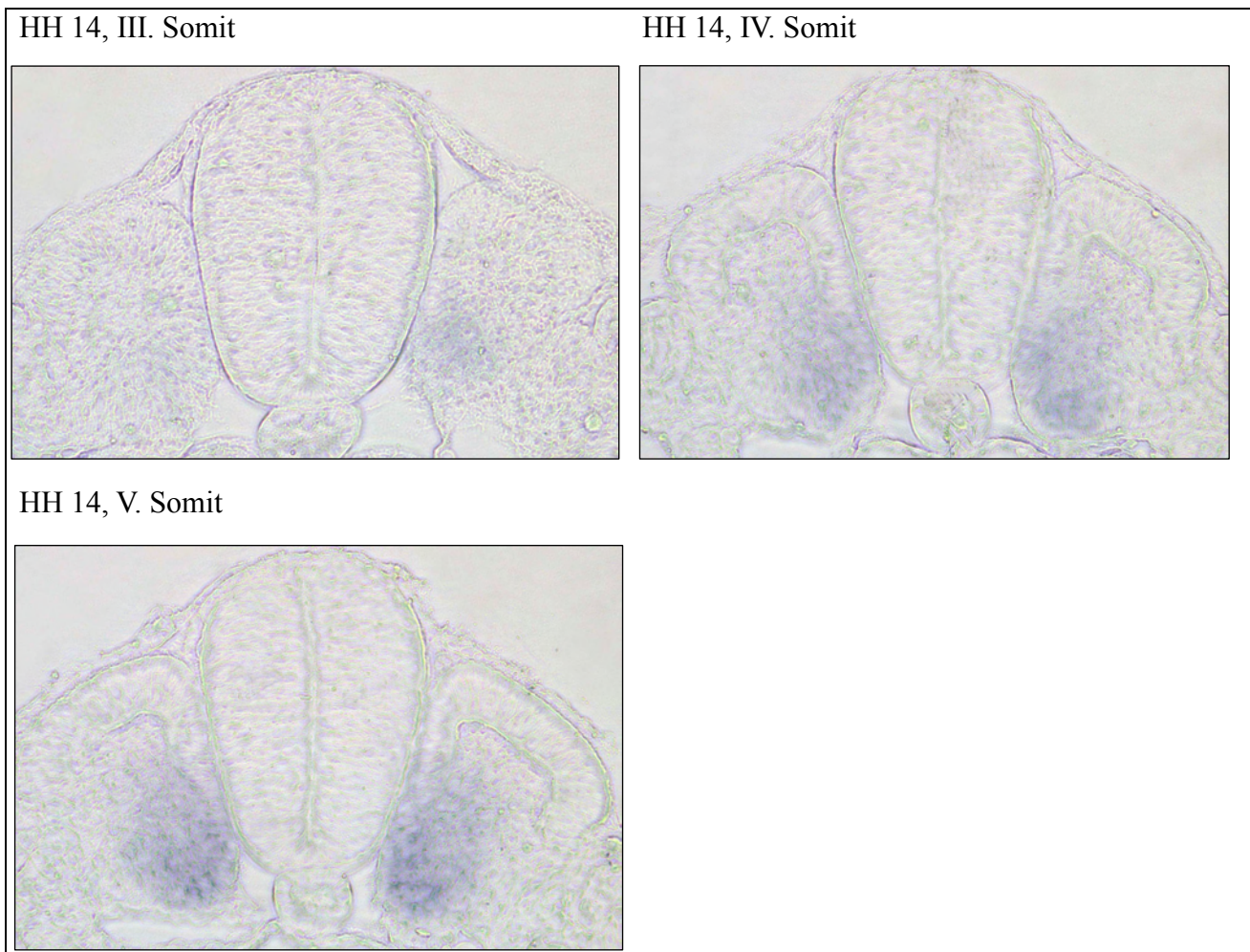


Abb. 36: Transversalschnitte des Stadiums HH 14, In-situ-Hybridisierung, Pax1; Vergrößerung: 20-fach

Das Stadium **HH 15** mit 25 Somiten zeigt im whole mount die Somiten I-III ohne Expression, den IV. Somiten mit geringer Expression und die Somiten V- XXV mit vollständiger Expression.



Abb. 37: HH 15, 25 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Dies unterstützen die Vibratonschnitte des IV. Somiten, bei dem der Somit noch epithelial ist jedoch eine Expression vorhanden ist. Der Vibratonschnitt des V. Somiten zeigt einen kompartimentierten Somiten mit deutlicher *Pax1* Expression.

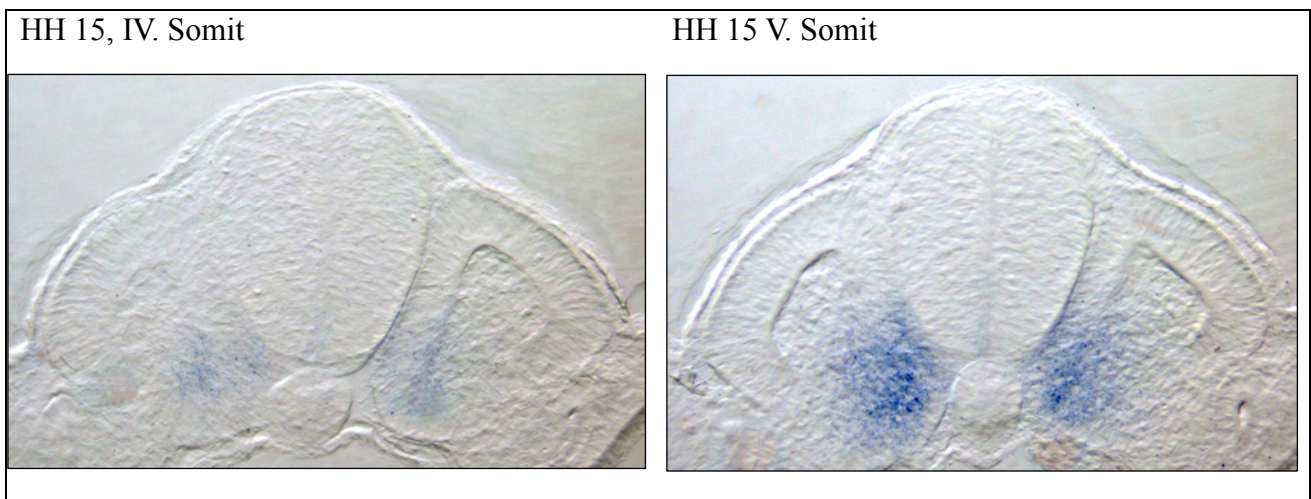


Abb. 38 Transversalschnitte des Stadiums HH 15, In-situ-Hybridisierung, *Pax1*; Vergrößerung: 20-fach

3.3.2. *MyoD* (Myotom)

Zur genaueren Darstellung der Myotomzellen wurden die Stadien HH 7-HH 14 einer In-situ-Hybridisierung mit *MyoD* unterzogen. Schon am whole mount sieht man, dass Myotomzellen später vorhanden sind als Sklerotomzellen. Die erste Expression ist im HH Stadium 13 zu erkennen.



Abb. 39: HH 12 (ohne Expression), Vergrößerung: 2,5-fach

Im Stadium **HH 13** sieht man, dass die Somiten I-VI keine Expression zeigen. Die Somiten VII-XIX zeigen eine deutliche schmale Markierung des medialen Myotoms.

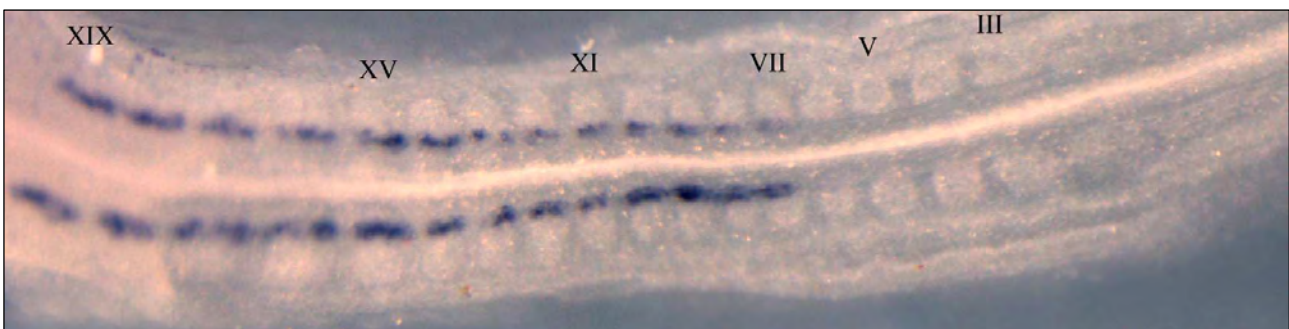


Abb. 40: HH 13, 19 Somiten; Vergrößerung: 2,5-fach

Die Vibratomschnitte bestätigen dies. Auch hier zeigt der VII. Somit die erste, wenn auch schwache Expression. Der VIII. Somit zeigt eine kräftige Färbung.

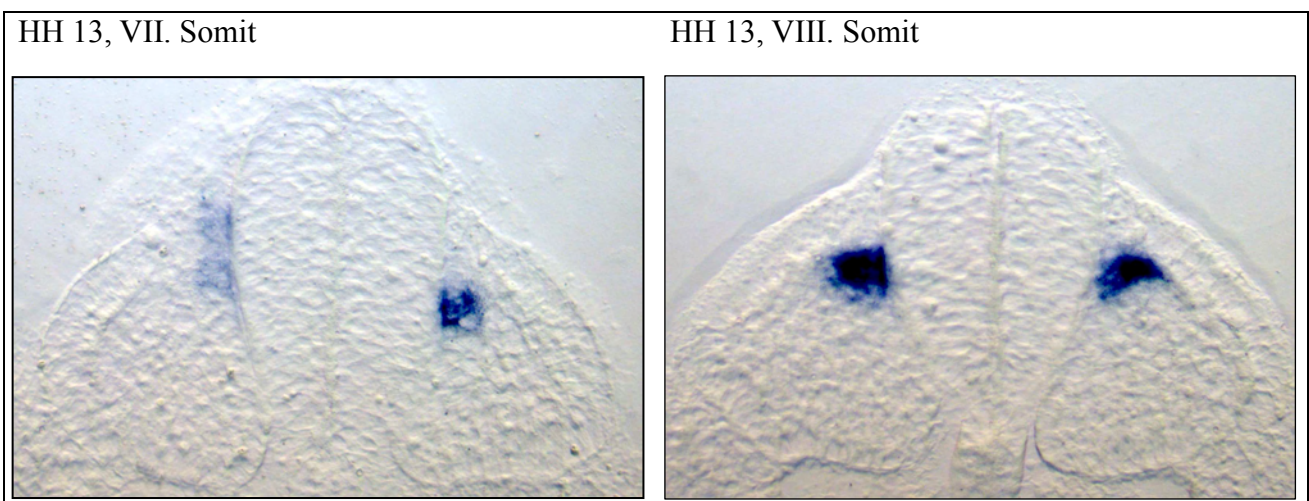


Abb.41: Transversalschnitte des Stadiums HH 13, In-situ-Hybridisierung, *MyoD*; Vergrößerung: 20-fach

Am whole mount des Stadiums **HH 14** mit insgesamt 22 Somiten ist zu erkennen, dass sich die Somiten I-III ohne Expression darstellen. Die Somiten IV und V zeigen schwache Expression und ab dem VI. Somiten ist eine deutliche Expression zu sehen.

Dies bestätigt sich anhand der Vibratomschnitte.

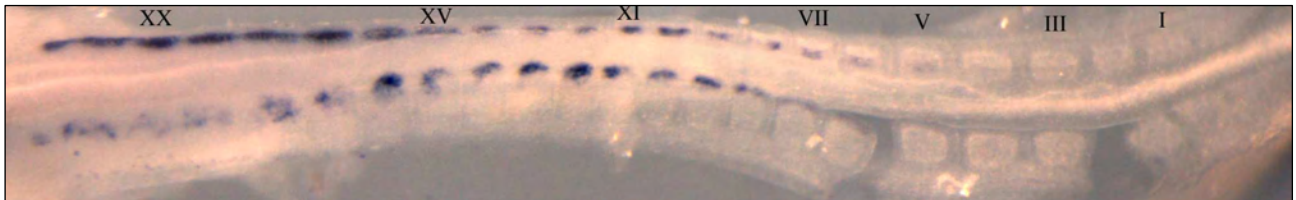


Abb. 42: HH 14 (22 Somiten); Vergrößerung: 2,5-fach

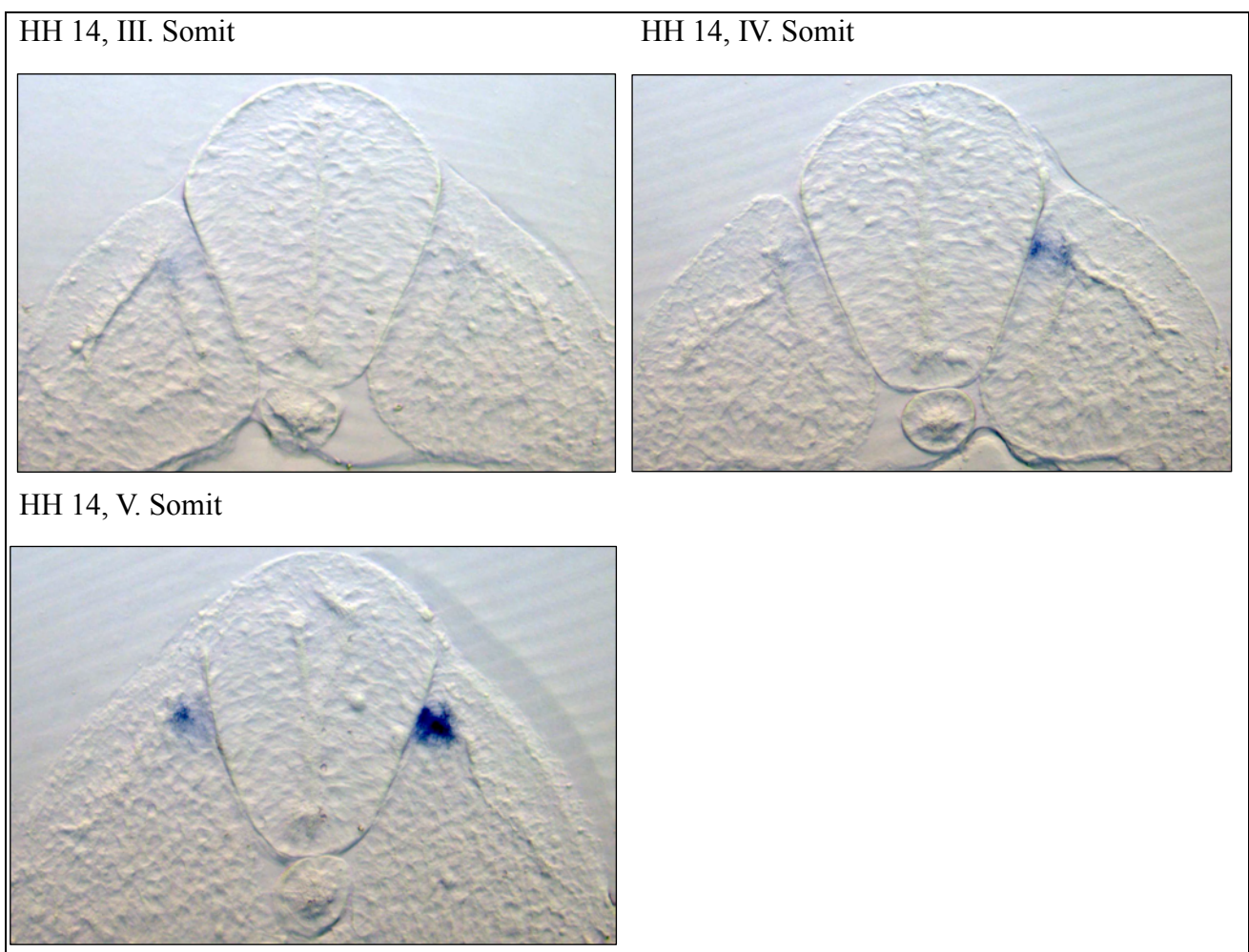


Abb.43: Transversalschnitte des Stadiums HH 14, In-situ-Hybridisierung, *MyoD*; Vergrößerung: 20-fach

Am whole mount des Stadiums **HH 15** mit insgesamt 25 Somiten erscheinen die Somiten I-III ohne Expression. Die Somiten IV und V weisen eine leicht Färbung auf. Ab dem VI Somiten ist eine kräftige Expression sichtbar.

Dies bestätigt sich anhand der Vibratonschnitte.

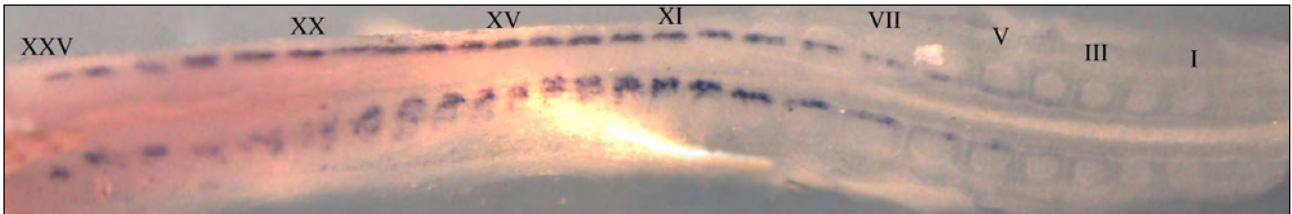


Abb. 44: HH 15 (25 Somiten); Vergrößerung: 2,5-fach

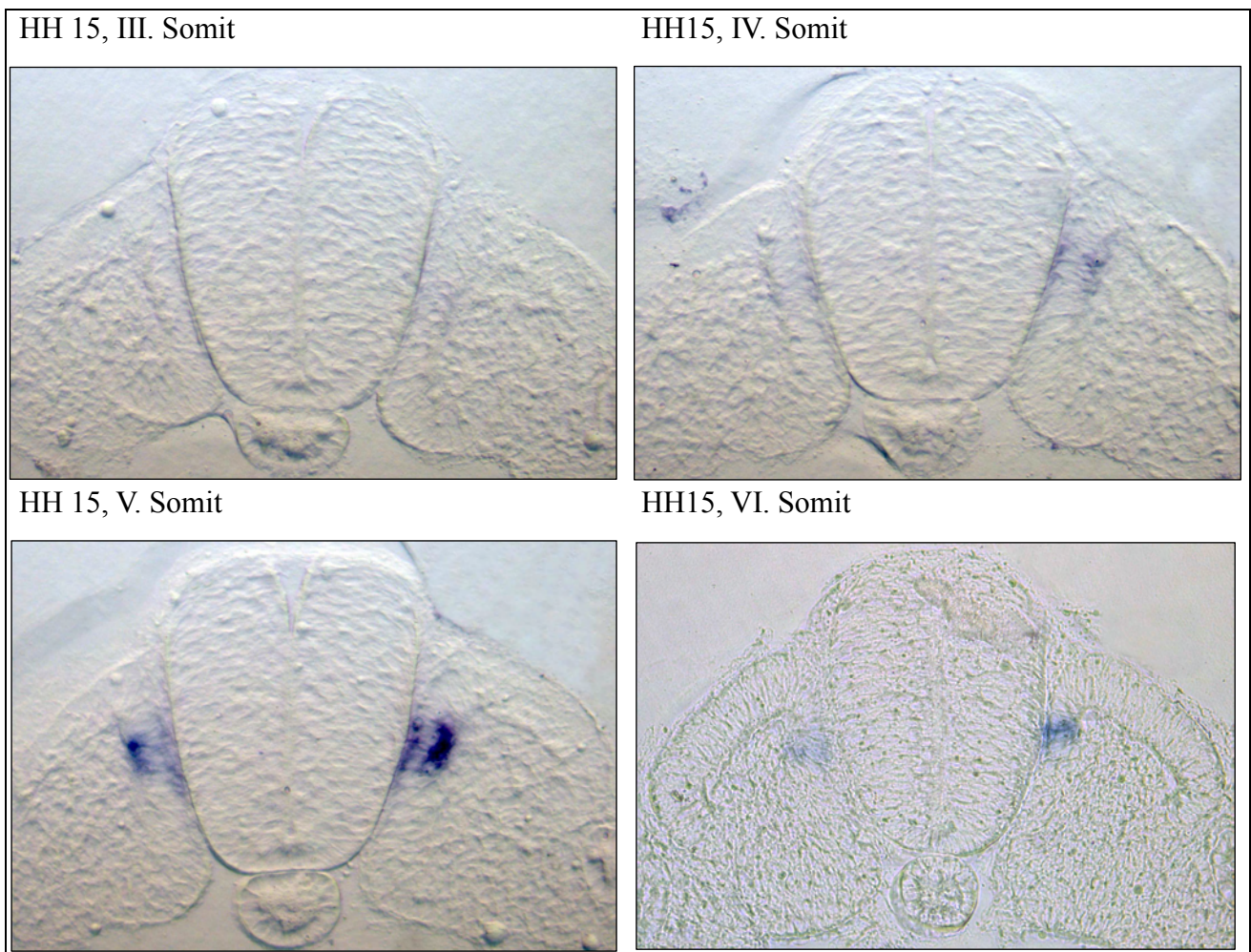


Abb.45: Transversalschnitte des Stadiums HH 15, In-situ-Hybridisierung, *MyoD*; Vergrößerung: 20-fach

3.3.3. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

	XXV	XXIV	XXIII	XXII	XXI	XX	XIX	XVIII	XVII	XVI	XV	XIV	XIII	XII	XI	X	IX	VIII	VII	VI	V	IV	III	II	I	
HH7 / 1 S.																										0
HH8 / 4 S.																						0	0	0	0	0
HH9 / 7 S.																			0	0	0	0	0	0	0	0
HH10 / 9 S.																	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>																	X	X	X	X	X					
HH10 / 10 S.																0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HH10 / 11 S.															0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>																X	X	X	X	X	X					
HH11 / 12 S.															0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HH11 / 13 S.												0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>													X	X	X	X	X	X	X	X						
HH12 / 15 S.											0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>											X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
HH13 / 18 S.										0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
<i>MyoD</i>																										
HH14 / 21 S.										0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>MyoD</i>										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HH15 / 25 S.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pax1</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>MyoD</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

0 vollständig epitheliale Somiten
 0 Übergangsstadium
 0 kompartmentierte Somiten
 X Pax1 Expression
 (X) schwache Pax1 Expression
 X MyoD Expression

Tabelle 1

HH Stadium	Somiten-anzahl	Morphologisch kompartmentierte S.	Morphologische Übergangsstadien	Somiten ohne <i>Pax1</i> Expression	Somiten ohne <i>MyoD</i> Expr.
HH 10	9 Somiten	nicht untersucht	n.u.	4	keine Expression
HH 10	11 Somiten	1	4	5	keine Expression
HH 11	12 Somiten	2	3	n.u.	keine Expression
HH 11	13 Somiten	4	3	n.u.	keine Expression
HH 11	14 Somiten	n.u.	n.u.	6	keine Expression
HH 12	15 Somiten	8	1	n.u.	keine Expression
HH 12	16 Somiten	n.u.	n.u.	6	keine Expression
HH 13	18 Somiten	10	2	7	keine Expression
HH 13	19 Somiten	n.u.	n.u.	n.u.	5
HH 14	21 Somiten	15	1	n.u.	n.u.
HH 14	22 Somiten	n.u.	n.u.	3	3
HH 15	25 Somiten	21	1	3	3

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der morphologisch sichtbar kompartmentierten Somiten, Somiten mit morphologisch sichtbaren Übergangsstadien, Somiten ohne *Pax 1* Expression und Somiten ohne *MyoD* Expression der HH-Stadien 10 bis 15

4. Diskussion

4.1. Anzahl epithelialer Somiten

Nachdem sich die Somiten vom unsegmentierten paraxialen Mesoderm abgeschnürt haben, entwickeln sie sich von kaudal nach kranial weiter. Das bedeutet, dass die kaudal gelegenen Somiten die jüngsten Somiten sind, und die ältesten, also am weitesten entwickelten Somiten kranial liegen. In der Literatur wird für die thorakalen und lumbalen Somiten beschrieben, dass die Somiten I-III epitheliale Struktur besitzen. In ihrem Lumen befinden sich mesenchymale Zellen, welche als Somitozölzellen bezeichnet werden (Christ und Ordahl 1995; Scaal und Christ 2004).

In dieser Arbeit zeigt sich, dass die Verhältnisse in den jüngeren HH-Stadien von dieser Angabe abweichen. Epithelial sind im Stadium HH 7 (1 Somit) der Somit I, im Stadium HH 8 (4 Somiten) die Somiten I-IV, im Stadium HH 9 (7 Somiten) die Somiten I-VII, im Stadium HH 10 (9 Somiten bzw. 11 Somiten) die Somiten I-IV bzw. I-V, im Stadium HH 11 (14 Somiten) die Somiten I-VII bzw. I-VI, im Stadium HH 12 (16 Somiten) die Somiten I-VI, im Stadium HH 13 (18 Somiten) die Somiten I-VI, und im Stadium HH 14 (22 Somiten) die Somiten I-IV bzw. I-III. Erst im Stadium HH 15 (25 Somiten) sind nur die Somiten I-III epithelial (siehe Tabelle 1 und 2).

Die Expression von *Pax1*, welche sich bekannter Weise schon in den ventromedialen Zellen der noch epithelialen Somiten findet (Deutsch et al. 1988; Ebensperger et al. 1995; Balling et al. 1996; Müller et al. 1996; Borycki et al. 1997) bestätigt die Anzahl der epithelialen Somiten. Ohne *Pax1*-Expression sind alle Somiten der HH-Stadien 7-9, im HH-Stadium 10 mit 9 Somiten die Somiten I-IV, im HH-Stadium 10 mit 11 Somiten die Somiten I-V, im HH-Stadium 11 die Somiten I-VI, im HH-Stadium 12 die Somiten I-VI, und im HH-Stadium 13 die Somiten I-VII. Erst in den HH-Stadien 14 und 15 sind die Somiten I-III ohne *Pax1* Expression (siehe Tabelle 1 und 2).

Das HH-Stadium 9 mit 7 Somiten ist das letzte Stadium mit nur epithelialen Somiten. Im HH-Stadium 10 mit 9 Somiten ist ein synchroner Beginn der *Pax1* Expression in den Somiten V bis IX zu beobachten. In diesem Stadium sind die Somiten I-IV ohne *Pax1*-Expression und damit vollständig epithelial ohne den Beginn sklerotomaler Differenzierung.

4.2. Zeitpunkt des ersten epithelio-mesenchymalen Übergangs

Hamilton schrieb in seinem erstmals 1908 veröffentlichten Buch, welches mir in der Auflage von 1952 vorliegt, „Lillie's Development of the Chick“, dass der erste leicht zu identifizierende Somit bestehen bleibt, bis eine Anzahl von ungefähr zehn Somiten erreicht ist, bevor er anfängt sich zu zerstreuen.

Der Zeitpunkt der ersten Veränderung zu einem Zeitpunkt von „ungefähr 10 Somiten“ wird in dieser Arbeit bestätigt. Das HH-Stadium 10 mit 9 Somiten, sowie das mit 10 Somiten zeigen, nur

morphologisch betrachtet, alle Somiten in epithelialer Form. Die Somiten sind, wenn sie genau in der Mitte geschnitten sind, kugelförmig und bestehen aus flaschenförmigen Epithelzellen, welche mit dem Flaschenhals zur Mitte hin angeordnet sind. Nach außen hin werden sie von einer Basalmembran begrenzt. Diese epithelialen Zellen begrenzen ein Lumen, das Somitozöl, welches mit Somitozöllen gefüllt ist.

Die *Pax1*-Expression tritt im HH-Stadium 10 mit 9 Somiten in den Somiten V-IX synchron auf. Dies entspricht den Beobachtungen beim Zebrafisch, dass die Zellen der ersten 5 Somiten auf einmal einer epithelio-mesenchymalen Transition (EMT) unterliegen. Beim Zebrafisch tritt dies bereits im HH-Stadium 9 mit 7 Somiten auf (van Eeden et al. 1996).

Im HH-Stadium 10 mit 11 Somiten kann die erste morphologische epithelio-mesenchymale Transition (EMT) beobachtet werden. Die Somiten I bis VI erscheinen vollständig epithelial. Die Somiten VII bis X lassen eine zunehmend aufgelockerte Struktur im ventrale Bereich erkennen. Erst der XI. Somit erscheint morphologisch vollständig kompartmentiert.

Die *Pax1*-Expression im HH-Stadium 10 mit 11 Somiten bestätigt, dass die morphologisch erkennbare veränderte Struktur mit der Expression von *Pax1* einhergeht. Der VI. Somit, bei dem morphologisch noch keine Veränderung erkennbar ist, zeigt eine schwache *Pax1*-Expression. Die Somiten VII bis XI zeigen eine deutliche Expression von *Pax1*.

Diese Beobachtungen ermöglichen die Festlegung des HH-Stadiums 10 als Stadium der ersten epithelio-mesenchymalen Transition. Im HH-Stadium 10 mit 9 Somiten erfolgt die erste synchrone Mesenchymalisierung der Somiten V-IX also der ältesten 5 Somiten.

Dies ist rein morphologisch noch nicht zu erkennen, da es sich um den Beginn sklerotomaler Differenzierung handelt. Die erste morphologisch sichtbare Veränderung findet sich im HH-Stadium 10 mit 11 Somiten. Hier betätigt sich die synchrone Mesenchymalisierung, welche in den Somiten VII bis XI zu erkennen ist.

4.3. Epithelio-mesenchymaler Übergang in den Stadien HH 11-HH 15

Es wurde für die thorakalen und lumbalen Somiten beschrieben, dass in den Somiten IV-V die Zellen der ventralen Somitenhälfte ihre Basalmembran verlieren und eine epithelio-mesenchymale Umwandlung durchmachen, um das Sklerotom zu bilden (Christ und Ordahl 1995; Scaal und Christ 2004).

Eine erste ventrale Auflockerung sieht man morphologisch im HH-Stadium 10 mit 11 Somiten im VII. Somiten, im HH-Stadium 11 im VII. bzw. VIII. Somiten, in den HH-Stadien 12 und 13 im VII. Somiten und im HH-Stadium 14 im VI. Somiten (siehe Tabelle 1).

Zieht man die Beobachtungen der *Pax1*-Expressionsstudie hinzu, ist der erste Somit mit einer

Mesenchymalisierung im HH Stadium 10 mit 9 Somiten der V. Somit, im HH Stadium 10 mit 11 Somiten der VI. Somit, im HH Stadium 11 und 12 der VII. Somit, im HH Stadium 13 der VIII Somit und in den HH Stadien 14 und 15 der IV. Somit. (siehe Tabelle 1)

Kurz nach der Deepithelialisierung der Skleromzellen formen die übrigen dorsal gelegenen epithelialen Somitenzellen das Dermomyotom. Dieses liegt dorsolateral über dem Sklerotom. Die Entstehung des Dermomyotoms wird für die thorakalen und lumbalen Somiten in den Somiten V-VII beschrieben (Christ et al. 2004; Scaal und Christ 2004).

Morphologisch ist in den Stadien HH 10 bis HH 13 die Form des Dermomyotoms zu erkennen. Die erste *MyoD*-Expression zur Darstellung des Myotoms zeigt sich im HH-Stadium 13 mit 19 Somiten. Sie tritt in den Somiten VII-XIX synchron auf.

In Tabelle 2 ist die Anzahl der epithelialen Somiten, also der ohne *Pax1* Expression, die Anzahl der Somiten ohne *MyoD* Expression, die Anzahl der morphologisch sichtbaren Übergangsstadien und der morphologisch sichtbar kompartimentierten Somiten zusammengefasst.

Die Anzahl der epithelialen Somiten, also ohne *Pax1*-Expression steigt über die Stadien HH 10 bis HH 13 von 4 auf 7 Somiten an. Vom Stadium HH 13 auf HH 14 fällt die Anzahl der epithelialen Somiten von 7 auf 3 Somiten und bleibt im Stadium HH 15 bei 3 Somiten. Dies entspricht der Angabe für die thorakalen und lumbalen Somiten.

Die erste *MyoD* Expression tritt im Stadium HH 13 mit 19 Somiten auf. In diesem Stadium sind 5 Somiten ohne *MyoD* Expression. In den Stadien HH 14 und 15 sind 3 Somiten ohne *MyoD* Expression.

Die Anzahl der sich in einem morphologischen Übergangsstadium befindlichen Somiten schwankt zwischen 1 und 4 Somiten.

4.4. *Pax1* Expression

Die Expression von *Pax1* tritt bereits in den ventromedialen Zellen der noch epithelialen Somiten auf (Deutsch et al. 1988; Ebensperger et al. 1995; Balling et al. 1996; Müller et al. 1996; Borycki et al. 1997). Die *Pax1* Expression charakterisiert die epithelio-mesenchymale Transition (Müller et al. 1996).

Auch in dieser Arbeit ist zu beobachten, dass die Expression von *Pax1* der morphologisch sichtbaren Deepithelialisierung vorausgeht. Die erste *Pax1* Expression ist im Stadium HH 10 mit 9 Somiten zu sehen. Sie tritt bei den Somiten V-IX, den ersten 5 Somiten, synchron auf. Morphologisch erscheinen alle 5 Somiten epithelial.

Im Stadium HH 10 mit 11 Somiten erscheinen die Somiten I-VI morphologisch epithelial. Eine *Pax1* Expression findet sich jedoch schon im VI. Somiten. Es ist also ein morphologisch epithelialer

Somit mit *Pax1* Expression vorhanden. In den Stadien HH 11, 12 und 13 entspricht die Morphologie der Somiten der *Pax1* Expression. In diesen Stadien wirkt der VII. Somit aufgelockert, dieser zeigt auch die erste *Pax1* Expression. Im Stadium HH 14 sind die Somiten IV und V morphologisch epithelial, zeigen jedoch schon *Pax1* Expression. Im Stadium HH 15 wirkt der IV. Somit morphologisch aufgelockert und zeigt auch *Pax1* Expression (siehe Tabelle 1).

4.5. *MyoD* Expression

Die erste molekulare Manifestation der Differenzierung zu Muskelzellen ist die Expression von MRFs (Muscle regulatory factor). Beim Hühnerembryo wird als erster MRF *MyoD* exprimiert, gefolgt von *Myf5* (Scaal und Christ 2004).

Es ist in der Literatur beschrieben, dass die Expression von *MyoD*, im Bereich der thorakalen und lumbalen Somiten, im Somitenstadium II auftritt (Christ und Ordahl 1995).

Außerdem ist beschrieben, dass die ersten Myotomzellen in den Somiten VI und VII auftreten. Dies wurde durch Desminfärbung sichtbar gemacht (Kaehn et al. 1988; Tosney et al. 1994).

Bei Embryonen des Stadiums 12 mit 15 Somiten und jüngeren Stadien kann keine Desmin-Expression beobachtet werden. Bei Embryonen der Stadien 12 bis 15 wird Desmin-Expression in immer weiter kaudal gelegenen Somiten beobachtet. Die erste Expression von Desmin tritt im Stadium HH 12 mit 16 Somiten in den 4 ältesten Somiten synchron auf. Embryonen der Stadien 16 und älter zeigen eine Desmin-Expression in allen Somiten außer den kaudalen 6 Somiten, also den 6 jüngsten Somiten (Borman und Yorde 1994).

Die erste Expression von *MyoD* findet sich in meinen Untersuchungen im HH-Stadium 13 mit 19 Somiten. Die Farbreaktion ist angrenzend an das Neuralrohr, im medialen Anteil des Somiten, ventral des Dermomyotoms zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt wandern die ersten Dermomyotomzellen unter das Dermomyotom, um das Myotom zu bilden.

Die Expression von *MyoD* tritt im HH-Stadium 13 mit 19 Somiten bei den Somiten VIII-XIX, bei den 13 ältesten Somiten, synchron auf. Es ist festzustellen, dass die Entstehung des Myotoms also nicht bei einem oder zwei Somiten zuerst auftritt, sondern mehrere Somiten gleichzeitig mit der Bildung von Myotomzellen beginnen. Die Expression von Desmin im HH-Stadium 13 mit 19 Somiten zeigt sich in den Somiten XI-XIX, also den 9 ältesten Somiten.

Im HH-Stadium 14 mit 22 Somiten exprimieren die Somiten IV bis XXII (18 Somiten) *MyoD* (siehe Tabelle 1 und 2). Im HH-Stadium 14 mit 22 Somiten zeigen die Somiten XIII-XXII (14 Somiten) eine Desmin-Expression.

Im HH-Stadium 15 mit 25 Somiten exprimieren die Somiten IV-XXV (21 Somiten) *MyoD*. Im Stadium HH 15 mit 25 Somiten sieht man die Desmin-Expression in den Somiten X-XXV (15

Somiten) (Borman und Yorde 1994).

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Expression von *MyoD* der von Desmin um 3-4 Somiten vorausgeht.

Die bekannten Verhältnisse der Desmin-Expression unterstützen die Ergebnisse der *MyoD*-Expression im Hinblick auf einen synchronen Beginn der Myotombildung über mehrere Segmente hinweg.

5. Zusammenfassung

In den Untersuchungen wurde die Somitenreifung und Kompartimentierung der okzipitalen und zervikalen Somiten untersucht. Beim Hühnerembryo werden die Somiten 1-5 als okzipitale und die Somiten 5-19 als zervikale Somiten festgelegt.

Es wurden befruchtete Hühnereier 23 bis 55 Stunden bebrütet und Embryonen der Stadien HH 7 (1 Somitenpaar) bis HH 15 (25 Somitenpaare) isoliert. Ein Teil der Embryonen wurde in Kunstharz eingebettet und 0,75µm dünn sagittal oder transversal geschnitten, anschließend lichtmikroskopisch untersucht und fotografiert.

Der andere Teil der Embryonen wurde In-situ-Hybridisierungen zur Darstellung der Expression der Gene *Pax1*, als Marker für das Sklerotom und *MyoD*, als Marker für das Myotom unterzogen. Diese Embryonen wurden in Agar eingebettet und 35µm dünn transversal geschnitten anschließend auch lichtmikroskopisch untersucht und fotografiert.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Bis zum Stadium HH 9 mit 7 Somiten sind alle Somiten epithelial.

Im Stadium HH 10 mit 9 Somiten ist der synchrone Beginn sklerotomaler Differenzierung, also der *Pax1* Expression in den Somiten V-IX, den 5 ältesten Somiten, zu beobachten.

Die Anzahl der epithelialen Somiten, also ohne *Pax1*-Expression steigt über die Stadien HH 10 bis HH 13 von 4 auf 7 Somiten an. Vom Stadium HH 13 auf HH 14 fällt die Anzahl der epithelialen Somiten von 7 auf 3 Somiten und bleibt im Stadium HH 15 bei 3 Somiten.

Im Stadium HH 13 mit 19 Somiten ist die erste Expression von *MyoD* zu beobachten. Sie tritt in den Somiten VII bis XIX, den 13 ältesten Somiten synchron auf. Im Stadium HH 14 mit 22 Somiten tritt *MyoD* Expression in den Somiten IV bis XXII, im Stadium HH 15 mit 25 Somiten in den Somiten IV bis XXV auf.

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Zeitpunkt des epithelio-mesenchymalen Übergangs der okzipitalen und zervikalen Somiten von dem der thorakalen und lumbalen Somiten abweicht.

Außerdem wird gezeigt, dass die Kompartimentierung der okzipitalen und zervikalen Somiten nicht in einzelnen Somiten, sondern über mehrere Somiten synchron beginnt.

Bisher lag keine systematische Beschreibung vor, die molekulare Marker mit einbezog, um die Entwicklung der okzipitalen und zervikalen Somiten zu verfolgen. Diese deskriptive Arbeit legt damit eine wichtige Grundlage für weitere experimentelle Studien zur Somitenentwicklung in dieser Region.

Summary

In this investigation the development and compartmentalization of the occipital and cervical somites in the avian embryo was studied, as so far no sufficient description of somite development in this region has been available. In the avian embryo occipital somites correspond to segments 1-5 and cervical somites correspond to segments 5-19.

Fertilized chicken eggs were incubated from 23 to 55 hours to reach stages between HH 7 (1 pair of somites) and HH 15 (25 pairs of somites). One part of the embryos were embedded in a synthetic resin and subject to transversal and sagittal semithin sections at 0,75µm. Subsequently they were examined and photographed using light microscopy.

The other part of the embryos underwent in-situ-Hybridisation using probes against *Pax1* as marker for the sclerotome and *MyoD* as marker for the myotome. These embryos were embedded in agar and sectioned transversally at 35µm. Subsequently they were also examined and photographed using light microscopy.

The results can be summarized as follows:

Until stage HH 9 with 7 somites all the somites are epithelial.

At stage HH 10 with 9 somites sclerotomal differentiation as monitored by *Pax1*-expression begins synchronously in somites V-IX, i.e. in the 5 oldest somites.

The number of the epithelial somites without *Pax1*-expression increases over the stages HH 10 to HH 13 from 4 to 7 somites. From stages HH 13 to HH 14 the number of epithelial somites decreases from 7 to 3 somites, and remains 3 somites in stage HH 15, thus corresponding to the situation at thoracal and lumbal levels.

At stage HH 13, with 19 somites, the first expression of *MyoD* as marker of the myotome is observed. It is upregulated synchronously in somites VII to XIX, i.e. in the 13 oldest somites. At stage HH 14, with 22 somites, *MyoD*-expression is observed in the somites IV to XXII, at HH 15, with 25 somites, in somites IV to XXV.

In summary, our results demonstrate that the onset of epithelio-mesenchymal transition in the occipital and cervical somites deviates from the thoracal and lumbal somites. Moreover, we show that in contrast to truncal levels, the compartmentalization of the occipital and cervical somites does not proceed successively but rather occurs synchronously in several somites.

Our study is the first systematic description of somite maturation at occipital and cervical levels including molecular markers of somite differentiation, thus providing the basis for further functional studies of somite development in these segments.

6. Literatur

- Aoyama, H. und K. Asamoto (1988). "Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis." Development **104**(1): 15-28.
- Balfour, F. M. (1881). Handbuch der vergleichenden Embryologie, Fischer, zitiert nach Christ, B., R. Huang und M. Scaal (2004). "Formation and differentiation of the avian sclerotome." Anat Embryol (Berl) **208**(5): 333-50.
- Balling, R., U. Helwig, J. Nadeau, A. Neubuser, W. Schmahl und K. Imai (1996). "Pax genes and skeletal development." Ann N Y Acad Sci **785**: 27-33.
- Bellairs, R. und E. J. Sanders (1986). "Somitomers in the chick tail bud: an SEM study." Anat Embryol (Berl) **175**(2): 235-40.
- Borman, W. H. und D. E. Yorde (1994). "Analysis of chick somite myogenesis by in situ confocal microscopy of desmin expression." J Histochem Cytochem **42**(2): 265-72.
- Borycki, A. G., K. E. Strunk, R. Savary und C. P. Emerson, Jr. (1997). "Distinct signal/response mechanisms regulate pax1 and QmyoD activation in sclerotomal and myotomal lineages of quail somites." Dev Biol **185**(2): 185-200.
- Brand-Saberi, B. und B. Christ (2000). "Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites." Curr Top Dev Biol **48**: 1-42.
- Christ, B., B. Brand-Saberi, M. Grim und J. Wilting (1992). "Local signalling in dermomyotomal cell type specification." Anat Embryol (Berl) **186**(5): 505-10.
- Christ, B., R. Huang und M. Scaal (2004). "Formation and differentiation of the avian sclerotome." Anat Embryol (Berl) **208**(5): 333-50.
- Christ, B., R. Huang und J. Wilting (2000). "The development of the avian vertebral column." Anat Embryol (Berl) **202**(3): 179-94.
- Christ, B., H. J. Jacob und M. Jacob (1972). "Experimental analysis of somitogenesis in the chick embryo." Z Anat Entwicklungsgesch **138**(1): 82-97.
- Christ, B., H. J. Jacob und M. Jacob (1975). "Experiments on the problem of reciprocal

- relationships between the mesoderm and ectoblasts in young chick embryos." Verh Anat Ges **69**: 837-40.
- Christ, B., H. J. Jacob und M. Jacob (1978). "Regional determination of early embryonic muscle primordium. Experimental studies on quail and chick embryos (demonstration)." Verh Anat Ges (72): 353-7.
- Christ, B. und C. P. Ordahl (1995). "Early stages of chick somite development." Anat Embryol (Berl) **191**(5): 381-96.
- Christ, B. W. (1998). "Medizinische Embryologie."
- Couly, G. F., P. M. Coltey und N. M. Le Douarin (1993). "The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras." Development **117**(2): 409-29.
- Dequeant, M. L., E. Glynn, K. Gaudenz, M. Wahl, J. Chen, A. Mushegian und O. Pourquie (2006). "A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock." Science **314**(5805): 1595-8.
- Deutsch, U., G. R. Dressler und P. Gruss (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.
- Dietrich, S., F. R. Schubert und P. Gruss (1993). "Altered Pax gene expression in murine notochord mutants: the notochord is required to initiate and maintain ventral identity in the somite." Mech Dev **44**(2-3): 189-207.
- Dietrich, S., F. R. Schubert und A. Lumsden (1997). "Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm." Development **124**(19): 3895-908.
- Dockter, J. L. (2000). "Sclerotome induction and differentiation." Curr Top Dev Biol **48**: 77-127.
- Dubrulle, J., M. J. McGrew und O. Pourquie (2001). "FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation." Cell **106**(2): 219-32.
- Ebensperger, C., J. Wilting, B. Brand-Saberi, Y. Mizutani, B. Christ, R. Balling und H. Koseki

- (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.
- Ebner, V. v. (1888). "Urwirbel und Neugliederung der Wirbelsäule." Sitzungsber Akad Wiss (III/97): 194- 206, zitiert nach Scaal, M. und B. Christ (2004). "Formation and differentiation of the avian dermomyotome." Anat Embryol (Berl) **208**(6): 411-24.
- Fan, C. M., C. S. Lee und M. Tessier-Lavigne (1997). "A role for WNT proteins in induction of dermomyotome." Dev Biol **191**(1): 160-5.
- Fan, C. M., J. A. Porter, C. Chiang, D. T. Chang, P. A. Beachy und M. Tessier-Lavigne (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.
- Goulding, M. D., A. Lumsden und P. Gruss (1993). "Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord." Development **117**(3): 1001-16.
- Gros, J., M. Manceau, V. Thome und C. Marcelle (2005). "A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells." Nature **435**(7044): 954-8.
- Hacker, A. und S. Guthrie (1998). "A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo." Development **125**(17): 3461-72.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." Morphol Jahrb. **88**:49-92, zitiert nach Christ, B. und C. P. Ordahl (1995). "Early stages of chick somite development." Anat Embryol (Berl) **191**(5): 381-96.
- Hamilton, H. L. (1952). Lillie`s development of the chick. An introduction to embryology. New York, Holt.
- Hamilton, H. L. und G. W. Hirsch (1956). "The developmental fate of the first somite of the chick." Anat Rec **125**(2): 225-45, zitiert nach Huang, R., Q. Zhi, C. P. Ordahl und B. Christ (1997). "The fate of the first avian somite." Anat Embryol (Berl) **195**(5): 435-49.
- Huang, R., Q. Zhi, A. Neubuser, T. S. Müller, B. Brand-Saberi, B. Christ und J. Wilting (1996).

- "Function of somite and somitocoele cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryos." Acta Anat (Basel) **155**(4): 231-41.
- Huang, R., Q. Zhi, C. P. Ordahl und B. Christ (1997). "The fate of the first avian somite." Anat Embryol (Berl) **195**(5): 435-49.
- Huang, R., Q. Zhi, K. Patel, J. Wilting und B. Christ (2000). "Contribution of single somites to the skeleton and muscles of the occipital and cervical regions in avian embryos." Anat Embryol (Berl) **202**(5): 375-83.
- Huang, R., Q. Zhi, C. Schmidt, J. Wilting, B. Brand-Saberi und B. Christ (2000). "Sclerotomal origin of the ribs." Development **127**(3): 527-32.
- Huang, R., Q. Zhi, J. Wilting und B. Christ (1994). "The fate of somitocoele cells in avian embryos." Anat Embryol (Berl) **190**(3): 243-50.
- Jaeger, J. (1926). "Über die Segmentierung der Hinterhauptregion und die Beziehung der Cartilago acrochordalis zur Mesodemcommissur.(Eine Untersuchung an Vögeln)." Morphol Jahrb.56:1-21, zitiert nach Huang, R., Q. Zhi, C. P. Ordahl und B. Christ (1997). "The fate of the first avian somite." Anat Embryol (Berl) **195**(5): 435-49.
- Jacobson, A. G. (1988). "Somitomes: mesodermal segments of vertebrate embryos." Development **104 Suppl**: 209-20.
- Kaehn, K., H. J. Jacob, B. Christ, K. Hinrichsen und R. E. Poelmann (1988). "The onset of myotome formation in the chick." Anat Embryol (Berl) **177**(3): 191-201.
- Kessel, M. und P. Gruss (1991). "Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid." Cell **67**(1): 89-104.
- Klessinger, S. und B. Christ (1996). "Axial structures control laterality in the distribution pattern of endothelial cells." Anat Embryol (Berl) **193**(4): 319-30.
- McMahon, J. A., S. Takada, L. B. Zimmerman, C. M. Fan, R. M. Harland und A. P. McMahon (1998). "Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite." Genes Dev **12**(10): 1438-52.

- Mittapalli, V. R., R. Huang, K. Patel, B. Christ und M. Scaal (2005). "Arthrotome: a specific joint forming compartment in the avian somite." Dev Dyn **234**(1): 48-53.
- Mootoosamy, R. C. und S. Dietrich (2002). "Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis." Development **129**(3): 573-83.
- Müller, T. S., C. Ebensperger, A. Neubuser, H. Koseki, R. Balling, B. Christ und J. Wilting (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.
- Nieto, M. A., K. Patel und D. G. Wilkinson (1996). "In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections." Methods Cell Biol **51**: 219-35.
- 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. und S. Meier (1983). "An experimental study of the somitomeric organization of the avian segmental plate." Dev Biol **97**(1): 191-202.
- Packard, D. S., Jr., R. Z. Zheng und D. C. Turner (1993). "Somite pattern regulation in the avian segmental plate mesoderm." Development **117**(2): 779-91.
- Palmeirim, I., D. Henrique, D. Ish-Horowicz und O. Pourquie (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." Cell **91**(5): 639-48.
- Remak, R. (1850). Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbeltiere. Berlin, Reimer, zitiert nach Christ, B., R. Huang und M. Scaal (2004). "Formation and differentiation of the avian sclerotome." Anat Embryol (Berl) **208**(5): 333-50.
- Rex, H. (1905). "Über das Mesoderm des Vorderkopfes der Lachmöve." Morphol Jahrb. 33:107-347, zitiert nach Huang, R., Q. Zhi, C. P. Ordahl und B. Christ (1997). "The fate of the first avian somite." Anat Embryol (Berl) **195**(5): 435-49.
- Sanders, E. J., M. K. Khare, V. C. Ooi und R. Bellairs (1986). "An experimental and morphological

- analysis of the tail bud mesenchyme of the chick embryo." Anat Embryol (Berl) **174**(2): 179-85.
- Scaal, M. und B. Christ (2004). "Formation and differentiation of the avian dermomyotome." Anat Embryol (Berl) **208**(6): 411-24.
- Solursh, M., M. Fisher, S. Meier und C. T. Singley (1979). "The role of extracellular matrix in the formation of the sclerotome." J Embryol Exp Morphol **54**: 75-98.
- Sparrow, D. B., G. Chapman, P. D. Turnpenny und S. L. Dunwoodie (2007). "Disruption of the somitic molecular clock causes abnormal vertebral segmentation." Birth Defects Res C Embryo Today **81**(2): 93-110.
- Spence, M. S., J. Yip und C. A. Erickson (1996). "The dorsal neural tube organizes the dermomyotome and induces axial myocytes in the avian embryo." Development **122**(1): 231-41.
- Tabin, C. J. und R. L. Johnson (2001). "Developmental biology: clocks and hox." Nature **412**(6849): 780-1.
- Tosney, K. W., D. B. Dehnbostel und C. A. Erickson (1994). "Neural crest cells prefer the myotome's basal lamina over the sclerotome as a substratum." Dev Biol **163**(2): 389-406.
- van Eeden, F. J., M. Granato, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C. P. Heisenberg, Y. J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, R. M. Warga, M. L. Allende, E. S. Weinberg und C. Nusslein-Volhard (1996). "Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*." Development **123**: 153-64.
- Williams, L. W. (1910). "The somites of the chick." Am J Anat **11**: 55-100.

7. Danksagung

Mein tiefer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Scaal für die Überlassung des Themas und die ständige, umfassende und freundliche Betreuung. Seine Geduld und Begeisterung für die Forschung haben mich beeindruckt und geprägt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bergmann für die Betreuung dieser extern angefertigten Doktorarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Kaleta für seine Stellungnahme und Korrektur.

Für die technische Assistenz danke ich Herrn Frank und Frau Baur.

Ich bedanke mich bei Kathrin Heim, Dr. Christoph Wiegrefte, Stefanie Krück, Susanne Theis und Katharina Puff für die angenehme Zusammenarbeit im Labor, für ihre Hilfestellung und Motivation.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Simon Hauri für seine menschliche und computertechnische Unterstützung, sowie seinem Ansporn für diese Arbeit und meinen Lebensweg.

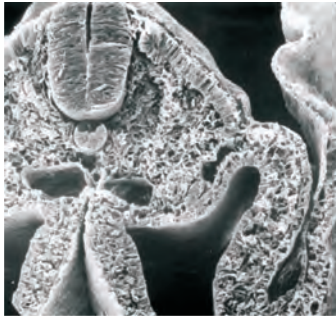
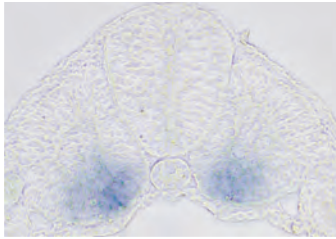
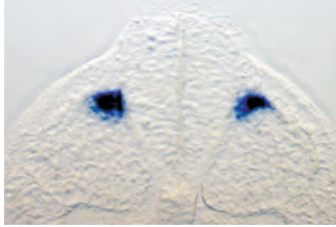
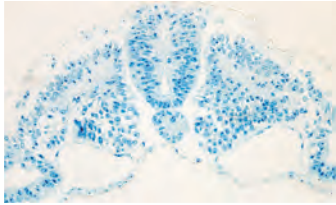
Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für Ihre unendliche Geduld und ständige Unterstützung.

8. 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.“

Freiburg, 18.03.2010

Anja Maschner



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: 978-3-8359-5610-0



9 783835 956100