

Aus dem Zentrum Anatomie
der Universität zu Köln
Institut I für Anatomie
Geschäftsführender Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Scaal

Entwicklung der intersegmentalen Arterien im Hühnerembryo

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Eva Maria Baumeister
aus Münster, Deutschland

promoviert am 24.03.2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Scaal

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Alejandre Alcázar

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung des medizinisch-technischen Assistenten Herr Andreas Peters und der Assistentin Frau Valentina Dörl durchgeführt worden.

Die Ergebnisse der angegebenen Experimente dieser Arbeit sind anschließend mit Herrn Professor Dr. Martin Scaal und Frau Doktor Margarethe Draga diskutiert und validiert worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Martin Scaal und Frau Dr. Margarethe Draga für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Vielen Dank für die produktiven Gespräche und die guten Ratschläge, nicht zuletzt in den finalen Zügen.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Andreas Peters und Valentina Dörl bedanken, für die unermütlche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung verschiedener Versuche. Ich bedanke mich bei Frau Prof. Felicitas Pröls und der gesamten Arbeitsgruppe Scaal für die tolle Forschungsatmosphäre und die gute Laune, wodurch die Zeit im Labor sehr kurzweilig geworden ist.

Für die finanzielle Unterstützung geht mein Dank an das Gremium von Köln Fortune, die es mir ermöglicht haben, Teil des Förderprogrammes im Bereich der Forschungsförderung zu werden.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die mentale Unterstützung, die vielen positiven Gedanken und Ermutigung während meiner Zeit im Labor, sowie anschließend im Schreibprozess.

Für meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1 ZUSAMMENFASSUNG	10
2 EINLEITUNG	12
2.1 Gastrulation	12
2.2 Entwicklung der Somiten	14
2.3 Differenzierung des Sklerotoms	17
2.4 Vaskularisierung in der embryonalen Entwicklung	20
2.5 Das Haushuhn (<i>Gallus gallus</i>) als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie	23
2.6 Wissenschaftliche Fragestellung	24
3 MATERIAL & METHODEN	26
3.1 Hühner, Inkubation (Stadien d3-d8)	26
3.2 Öffnen der Eier	26
3.3 Injektion ins Herz	27
3.4 Präparation der Schnitte	28
3.5 Immunhistochemie	29
3.6 Einbettung und Vibratom-Schnitte	31
3.7 Reagenzien	32
3.8 Geräte	35
4 ERGEBNISSE	37
4.1 Vorstellung der Morphologie des Hühnerembryos anhand schematischer Darstellungen früher Stadien	38

4.2 Morphologische Veränderungen der ISG in Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien	41
4.2.1 Morphogenese der Aorta	41
4.2.2 Morphogenese der ISG	42
4.2.3 Morphogenese der Äste der ISG	42
4.3 Vergleichende Versuchsergebnisse der Dil-Injektion und Immunhistochemie gegen Sox9	54
4.3.1 Sox9-Versuchsergebnisse der Stadien HH 20, HH 21	54
4.3.2 Sox9-Versuchsergebnisse der Stadien HH 26 – HH 30	56
4.4 Versuchsergebnisse der Vibratom-Schnitte bei den Stadien HH 29 - 31	62
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	64
5 DISKUSSION	65
5.1 Entwicklung der Intersegmentalgefäße in den Stadien HH 16 – HH 30	66
5.2 Entwicklung embryonaler Knorpel-Vorstufen der Stadien HH 20, HH 26 – HH 30	68
5.3 Ausblick	71
6 LITERATURVERZEICHNIS	73
7 ANHANG	80

Abkürzungsverzeichnis

A	Aorta
A	axiales Mesoderm
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANST	Anastomose
AO	Area opaca
AP	Area pellucida
ARD	Arteria radicularis dorsalis
art	arterielle ISG
ARV	Arteria radicularis ventralis
autoklav.	autoklaviert
Bmp	Bone morphogenic protein
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
C	Chorda
d.h.	das heißt
DM	Dermomyotom
DA	Dorsale Aorta
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
d	dorsal
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dr.	Doktor
Ec	Ektoderm
E	Endoderm
EMT	epithelio-mesenchymale Transition
EPC	endotheliale Progenitorzellen
engl.	englisch
et al.	und andere (latein: et alii)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktoren
g	Gramm
GaR	Goat anti Rabbit
GBS	Gelatin-BSA-Sucrose-Mix
H ₂ O	Wasser
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
HH	Hamburger und Hamilton, Stadien der Embryonalentwicklung
IC	Intraembryonales Coelom
ICG	Interkostalgefäß
IHC	Immunhistochemie
ISA	Intersegmentalarterie
ISB	Intersegmentalbereich
ISG	Intersegmentalgefäße
ISV	Intersegmentalvene
KPZ	Knorpelprogenitorzellen
KV	Kardinalvene
lat.	lateinisch
LP	Seitenplattenmesoderm (engl. lateral plate mesoderm)
LU	lumbal
MET	Mesenchym-Epithel-Transition
ml	Milliliter
N	number
NR	Neuralrohr
o.g.	oben genannt
P	paraxiales Mesoderm

pAK	Primär-Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20 (engl. phosphate-buffered saline with Tween 20)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert (lat. pondus hydrogenii)
Prof.	Professor
R	embryonale Rippen
RDS	Ramus dorsalis
RT	Raumtemperatur
S	Somit
SHh	Sonic hedgehog
SK	Sklerotom
s.o.	siehe oben
Somit I	Somit römisch eins, Zählweise von kaudal nach kranial
TH	thorakal
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
VEGF	Vascular endothelial growth factor
v	ventral
ven	venöse ISG
vgl.	vergleiche
WK	Wirbelkörper
X	extraembryonales Mesoderm
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent
α	Alpha
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung der Intersegmentalgefäße (ISG) des Hühnerembryos im Zusammenhang mit der Wirbelentwicklung untersucht.

Die paarigen ISG entspringen zu Beginn der Embryonalentwicklung der dorsalen Aorta und ziehen beidseits lateral am Neuralrohr vorbei. In frühen Embryonalstadien verlaufen sie dabei zwischen den Somiten im intersegmentalen Bereich, der im späteren Verlauf jedoch durch die Entwicklung der Wirbelkörper vollständig eingenommen wird. In der Forschung besteht die allgemeine Annahme, dass ein vollständiger Wirbelkörper aus Anteilen zweier aufeinanderfolgender Somiten entsteht. Das Sklerotom ist ein Bereich innerhalb jedes Somiten und für die Entwicklung diverser skelettaler Komponenten verantwortlich. Das kaudale Sklerotom eines Somiten und das kraniale Sklerotom des nach kaudal angrenzenden Somiten bilden demnach einen Wirbelkörper. Dieser Vorgang wird als Resegmentierung bezeichnet.

In der Arbeit wurden zum einen die Gefäße mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil markiert, zum anderen wurden die embryonalen Chondrozyten im Rahmen einer Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen Sox9 angefärbt. Diese Versuche wurden bei den Stadien HH 19 – HH 30 durchgeführt, wobei es galt, zwei Arbeitshypothesen zu überprüfen.

Die erste Hypothese nimmt an, dass die ISG durch die sich entwickelnden Skelettstrukturen der Wirbelsäule im intersegmentalen Bereich eingemauert werden und anschließend obliterieren, und dass die definitiven Wirbelgefäße neu gebildet werden. Nach der zweiten Hypothese werden die persistierenden ISG im Zuge der Entwicklung der Wirbelkörper nach lateral auf die Wirbeloberfläche verlagert (remodeling).

Nachdem den Wholemount-Hühnerembryonen Dil in das Herz injiziert wurde, wurden die Embryonen aus dem Ei isoliert und die Organe sorgfältig entnommen. Dann wurden thorakale, sowie lumbale Transversalschnitte angefertigt. Anschließend wurde bei den Schnitten, zur Darstellung der embryonalen Knorpelentwicklung, die Immunhistochemie gegen den Transkriptionsfaktor Sox9 durchgeführt.

Innerhalb der untersuchten Stadien konnte die Dynamik der Verlagerung der ISG im Kontext der Wirbelbildung und die Entstehung wichtiger Äste der ISG im Bereich der Wirbelsäule und des Rückenmarks gezeigt werden. Unter anderem geben die ISG die *Arteriae radicales ventralis* und *dorsalis* an das Neuralrohr ab, die paarigen Interkostalgefäße zur Versorgung der Rippen, sowie den *Ramus dorsalis* an das Gewebe dorsal des Neuralrohrs.

Durch die Entwicklung des Achsenskeletts, werden die ISG während der Stadien HH 26 – HH 30 nach außen verlagert und liegen dem embryonalen Wirbelkörper, als auch den Rippen ventral an.

Die Ergebnisse unterstützen die Arbeitshypothese, dass die ISG während der Resegmentierung und des folgenden Wachstums der Wirbelkörper nach lateral verdrängt

werden und so auf der lateralen Oberfläche der Wirbelkörper zu liegen kommen. Die Ergebnisse widerlegen die Alternativhypothese, dass die ISG im intersegmentalen Spalt obliterieren und durch neu aussprossende definitive Interkostalgefäße ersetzt werden. Das Aussprossen der Interkostalgefäße im engeren Sinne, also der die Rippen begleitenden Gefäße, konnte auf das Stadium HH24 festgelegt werden, und zwar durch angiogenetisches Aussprossen der ICG aus den nach lateral verlagerten ISG.

2 Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung der intersegmentalen Gefäße im Wirbeltierembryo zu beschreiben und deren Beziehung zur Entwicklung der Wirbelsäule aus dem Sklerotom zu verstehen.

Aus diesem Grund wird zunächst die Herkunft des Sklerotoms beschrieben. Dies wird in folgende Schritte gegliedert: Gastrulation, Somitogenese und Somitenkompartimentierung mit daraus resultierender Entstehung des Sklerotoms. Anschließend wird die Entstehung embryonaler Gefäße erläutert. Im Rahmen dieser verschiedenen Kapitel sollen die embryonalen Grundkenntnisse vermittelt werden, die zum Verständnis der Thematik, mit der sich diese Arbeit befasst, relevant sind.

2.1 Gastrulation

Der Begriff Gastrulation beschreibt einen Prozess in der Embryonalperiode von mehrzelligen Organismen, bei dem die drei Keimscheiben (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) entstehen und ihre endgültigen Positionen im Embryo einnehmen [1-3].

Die Gastrulation stellt die Grundlage für alle darauffolgenden Entwicklungen dar, wie beispielsweise die Bildung des paraxialen Mesoderms. Da sich aus diesem wiederum Strukturen entwickeln, mit denen sich die Arbeit befasst, wird der Prozess der Gastrulation an dieser Stelle kurz beschrieben.

Zu Beginn der Gastrulation besteht das Hühnerei aus ca. 20.000 Zellen die als bilaminäre Scheibe angeordnet sind [4]. Die Scheibe lässt sich in den einschichtigen Epiblasten und den darunter liegenden Hypoblasten einteilen.

Der Epiblast besteht aus der zentralen Area pellucida (AP), die von der Area opaca (AO) umgeben wird, welche dem Eidotter aufliegt.

Dies ist die Ausgangssituation für die Bildung des Primitivstreifens. Der Primitivstreifen ist die erste axiale Struktur während der embryonalen Entwicklung und formt das Grundgerüst für die Hauptkörperachse.

Zellen aus dem lateralen Teil der posterioren AP wandern zur zentralen Mittellinie. Dies geht mit einer Verdickung der posterioren Epiblasten-Zellen einher und markiert den Beginn des Primitivstreifens (Abb. 1). Dieser verlängert sich in anteriorer Richtung durch die Area pellucida. Sobald sich in der Mitte des Streifens eine Furche bildet, durchlaufen endodermale und mesodermale Progenitorzellen eine epithelial-zu-mesenchymale Transition (EMT), die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren. Dazu gehören beispielsweise die Zell-Zell-Kontakte sowie die apikal-basale Polarität [5]. Sie bewegen sich von lateral durch die Furche in den darunterliegenden Bereich zwischen Epiblast

und Hypoblast (siehe Pfeile Abb. 1). Diese Zellen bilden die mesodermalen und endodermalen Schichten des Embryos (Abb. 1).

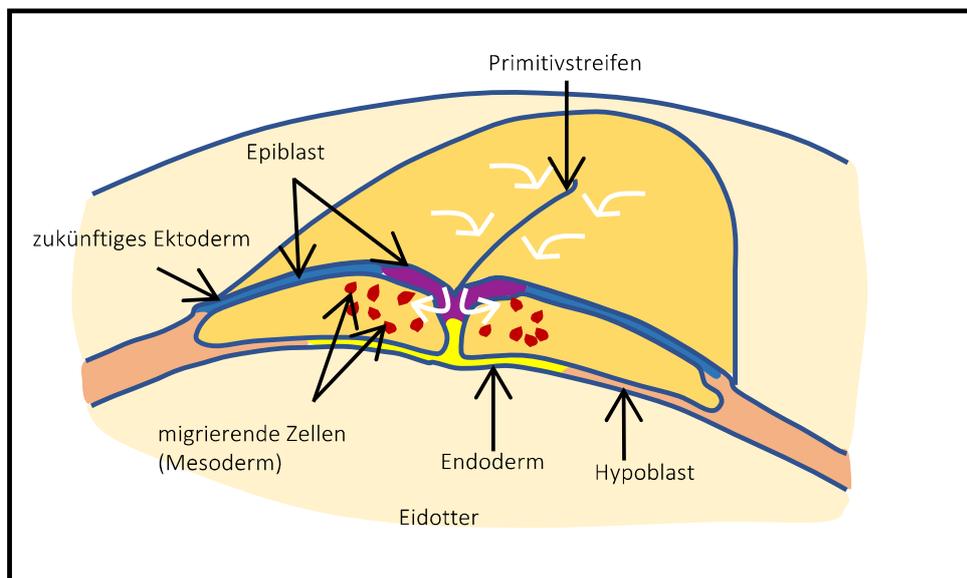


Abbildung 1 Bildung des Primitivstreifens während der Gastrulation im transversalen Schnitt: Unterteilung in Epiblast, Hypoblast, Mesoderm, Endoderm, Ektoderm (siehe Beschriftung); weiße Pfeile zeigen Verlauf der migrierenden mesodermalen und endodermalen Zellen (Balinsky, B. I. An Introduction to Embryology: Philadelphia (PA).). http://2.bp.blogspot.com/-Spjbonw5790/UWafj4ehM-I/AAAAAAAAACM/I1cPUZJZvbo/s1600/47_13ChickGastrulation.jpg (Zuletzt abgerufen am 22.11.2023))

Am vorderen Ende des Streifens entsteht ab Stadium HH 3+ eine Verdickung, der sogenannte Hensen'sche Knoten, der durch Expression von Goosecoid und Chordin die Rolle des Organisators übernimmt. Aus ihm geht das endgültige Endoderm hervor [6, 7] das den Hypoblast aus der Keimscheibe verdrängt. Die Stadienbezeichnung HH 3+ bezieht sich auf das von Hamburger und Hamilton 1951 entwickelte System, die Hühnerembryonen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften in 46 Stadien zu unterteilen [8].

Der restliche Teil des Primitivstreifens bildet das Mesoderm, dessen Zellen nach der Wanderung durch den Primitivstreifen zwischen Ektoderm und Endoderm nach lateral und kranial wandern und das in verschiedene Kompartimente eingeteilt werden kann [9]. Auf die weitere Differenzierung des Mesoderms wird im nächsten Kapitel detaillierter eingegangen. Das Ektoderm bildet sich aus Zellen des Epiblasten, die nicht durch den Primitivstreifen wandern.

Ab Stadium HH 4 entwickelt sich aus dem Ektoderm lateral und anterior des Hensen'schen Knotens die Neuralplatte und der Primitivstreifen nimmt keine weiteren Zellen aus diesem Bereich auf [10, 11].

Der vordere Anteil des Primitivstreifens enthält proliferierende Zellen, die u.a. an der Mesodermbildung teilnehmen. Bald darauf verkürzt sich der Primitivstreifen, indem der vordere Teil mit der Achsenbildung, also der Entwicklung der Chorda dorsalis und des paraxialen

Mesoderms, beginnt [9]. Dieser Prozess leitet die Segmentierung des Organismus ein, indem Somiten aus dem paraxialen Mesoderm entstehen [12].

2.2 Entwicklung der Somiten

Die Segmentierung des Körpers ist Grundvoraussetzung für die Fähigkeit der Wirbeltiere, Bewegungen auszuüben. Der Prozess der Segmentierung wird durch die Bildung von Somiten eingeleitet [13, 14]. Somiten sind die sogenannten Ursegmente im Embryo und unerlässlich für die Entwicklung der Muskulatur und der Wirbelsäule einschließlich der Rippen, deren Wachstum in dieser Arbeit in Zusammenhang zu den umliegenden Gefäßen schrittweise verfolgt wurde. Daher wird deren Bildung und Differenzierung in den folgenden Kapiteln in Grundzügen erläutert.

Das Mesoderm, welches sich im Prozess der Gastrulation entwickelt hat und im vorigen Kapitel kurz angeschnitten wurde, enthält die Zellen für alle Blutgefäße, Muskeln, Knochen, Knorpel und Bindegewebe des Rumpfes.

In der frühen embryonalen Entwicklung kann das Rumpf-Mesoderm in verschiedene Kompartimente unterteilt werden (Abb. 2 A).

Die Chorda dorsalis ist eines dieser Kompartimente und geht aus dem axialen Mesoderm hervor. Sie ist eine Vorstufe des axialen Skelettes, in der adulten Wirbelsäule bildet sie aber lediglich den Nucleus pulposus der Disci intervertebrales. Darüber hinaus besitzt die Chorda induktive Eigenschaften und hat auf diese Weise Einfluss auf die Bildung von Neuralrohr und Somiten [15-21].

Das laterale Mesoderm kann in zwei Schichten unterteilt werden: das somatische und das viszerale Mesoderm. Der Bereich zwischen diesen beiden Schichten – das Coelom – bildet die Vorstufe für die später entstehende Körperhöhle.

Aus dem somatischen Mesoderm entwickeln sich u.a. das Bindegewebe der ventrolateralen Körperwand und das Skelett der Extremitäten. Ausgenommen sind die Wirbelsäule, die Rippen [22], sowie ein Teil der Scapula [23], die Derivate der Somiten sind.

Das viszerale Mesoderm liefert das Anlagematerial für Herzmuskelzellen, sowie die glatte Muskulatur des Verdauungstraktes und eines Teils der Blutgefäße. Die Zellen aus diesem Bereich des Mesoderms sind nicht in der Lage, sich zu Skelettmuskulatur zu differenzieren [24-27].

Das intermediäre Mesoderm enthält Vorläuferzellen für die embryonale Nierenanlage und Anteile der inneren Geschlechtsorgane [28].

Zwischen dem intermedialen Mesoderm und den axialen Strukturen liegt schließlich das paraxiale Mesoderm. Dieses ist in der Lage, durch Bildung aufeinanderfolgender Somiten die

Segmentierung einzuleiten (Abb. 2 C). Da insbesondere diese Entwicklung für die Thematik der Arbeit von Interesse ist, wird an dieser Stelle explizit auf die Differenzierung der Somiten eingegangen.

Die Somitogenese wird durch eine komplexe Signalkaskade reguliert, bei der der Transmembran-Rezeptor Notch eine wichtige Rolle spielt [29].

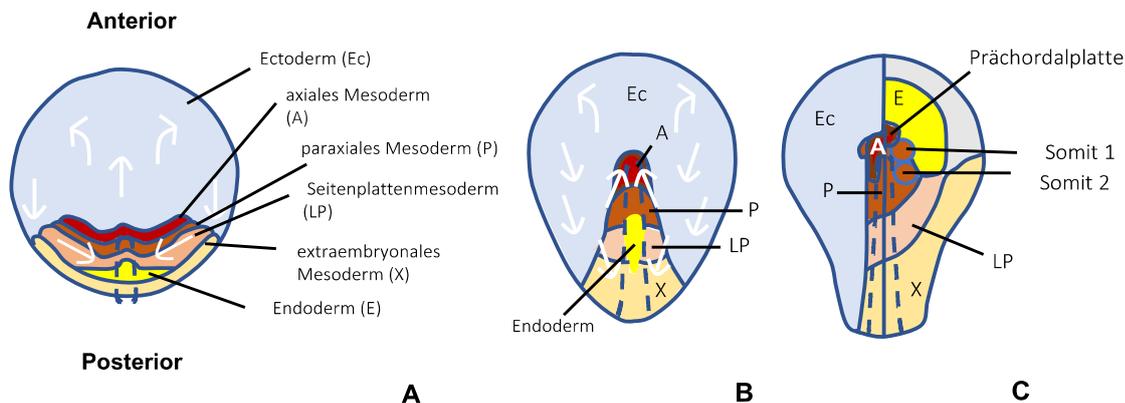


Abbildung 2 Differenzierung des Mesoderms in verschiedene Kompartimente (A, B) und dadurch Bildung von Somiten aus paraxialem Mesoderm (C): Ec = Ectoderm, A = axiales Mesoderm, P = paraxiales Mesoderm, LP = Seitenplattenmesoderm (engl. lateral plane mesoderm), X = extraembryonales Mesoderm, E = Endoderm, weiße Pfeile = Ausbreitungsrichtung (Gastrulation – Chick, Fish, Mammal: Developmental Biology – Biology 4361: <http://image.slidesharecdn.com/nps3c-120611000042-phapp01/95/nps3-c-11-728.jpg?cb=1339372936> (Zuletzt abgerufen am 22.11.2023))

Der Prozess beginnt am kranialen Ende des paraxialen Mesoderms und setzt sich nach kaudal hin fort. Neue Somiten entstehen, indem Zellen des präsomitischen paraxialen Mesoderms epithelialisiert werden (Mesenchym-Epithel-Transition, MET) und sich zu hohlkugelartigen Segmenten anordnen.

Die Gastrulation setzt sich währenddessen im persistierenden Primitivstreifen und später in der Schwanzknospe fort, wodurch am kaudalen Ende des noch nicht segmentierten, präsomitischen paraxialen Mesoderms ständig neue mesenchymale Zellen gebildet werden, so dass während der Somitogenese auf diese Weise das Längswachstum des Embryos fortschreitet [30-35].

Am kranialen Ende der Segmentplatte werden die Somiten fortlaufend zunächst als epitheliale Hohlkugeln abgeschnürt und je nach Alter in Somitenstadien eingeteilt. Der zuletzt gebildete, also jüngste Somit wird mit dem Stadium römisch I bezeichnet, die zuvor gebildeten älteren Somiten mit entsprechend aufsteigenden römischen Ziffern (II, III etc.), die entsprechende Reifungsstadien des Somiten repräsentieren (siehe Abb. 3) [12].

Die neu entstandenen Somiten bestehen zunächst aus einem epithelialen Ball hochprismatischer Epithelzellen, die außen einer Basallamina aufsitzen und apikal ein Lumen umschließen – das Somitocoel. Dieses enthält mesenchymale Zellen [36] (siehe Abb. 3).

Die extrazelluläre Matrix um den Somiten enthält verschiedene extrazelluläre Fasern, wie beispielsweise Laminin, und verbindet diesen mit den angrenzenden Strukturen: Neuralrohr, Chorda dorsalis, Ektoderm, Endoderm, Aorta und Wolff Gang, sowie die sich nach kranial und kaudal anschließenden benachbarten Somiten.

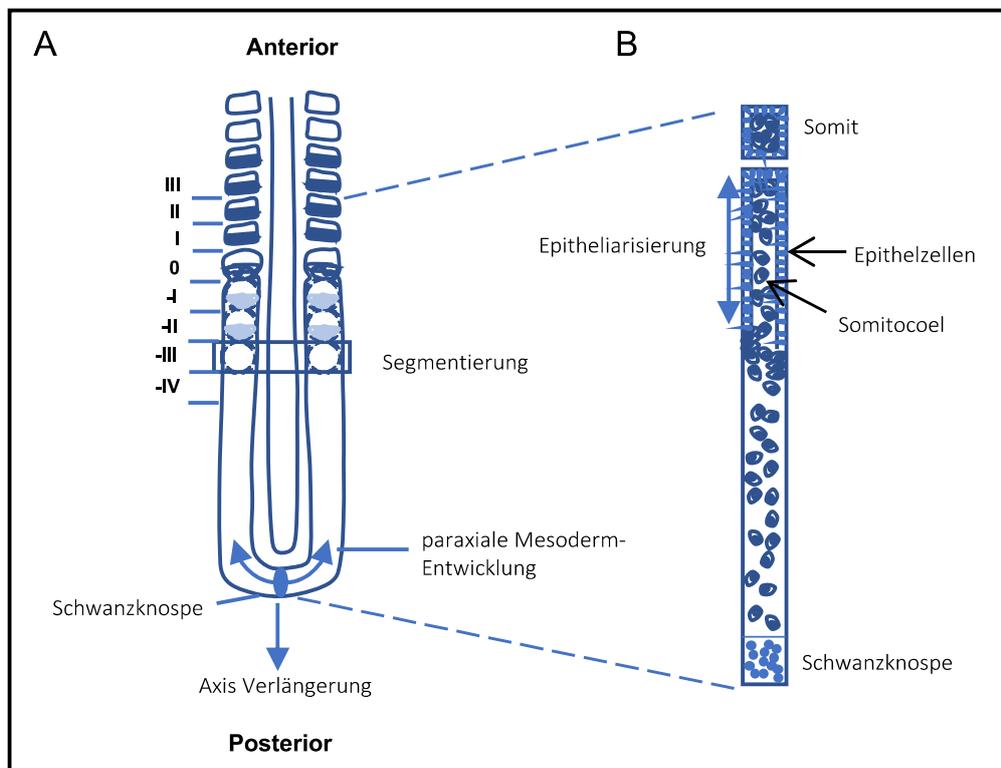


Abbildung 3 Entstehung neuer Somiten in kranio-kaudaler Richtung, neu entstandene Somiten bestehen aus Epithelzellen und mesenchymalen Zellen des Somitocoels (B: siehe Pfeile): III - I = initial ausgereifte Somiten; 0 = neu entstandener Somit; (-I) - (-III) = unvollständig ausgereifte Somiten; -IV = Entstehungsprozess hat noch nicht begonnen (Dubrulle, J., Pourquié, O. Coupling segmentation to axis formation: Development.

https://www.researchgate.net/profile/Julien_Dubrulle/publication/51370463/figure/fig1/AS:341263439155202@1458374952265/The-successive-steps-in-somitogenesis-A-The-caudal-part-of-a-2-day-old-chicken-embryo.png (Zuletzt abgerufen am 22.11.2023))

Im Verlauf der Somiten-Stadien V-VII entwickelt sich die dorsale Somitenhälfte zum Dermomyotom, während ventrale Hälfte und Somitocoel das Sklerotom bilden [37].

Diese dorsoventrale Differenzierung steht unter der Kontrolle verschiedener signalgebender Gene. *Wnt-1*, *-3a* und *-4* aus dem dorsalen Neuralrohr fördern beispielsweise eine verstärkte Expression von *Pax-3*, einem Markergen für das Dermomyotom, sowie von *MyoD*, einem Markergen für das Myotom, im dorsalen Bereich der Somiten [38].

In der ventralen Hälfte und im Somitocoel wird die Expression von *Pax-3* herunterreguliert, während *Pax-1* und *Pax-9* Gene, als Markergene für das Sklerotom, verstärkt exprimiert werden. Die Regulierung von *Pax-1* und *Pax-9* ist abhängig von Signalen aus Chorda dorsalis und ventralem Neuralrohr [16, 39, 40].

Echelard et al. und Riddle et al. konnten 1993 unabhängig voneinander feststellen, dass Sonic hedgehog (Shh) aus der Chorda dorsalis die Ventralisierung der Somiten und damit die Sklerotombildung induziert [41, 42]. Die Entwicklung des dorsalen Dermomyotoms wird hier nicht näher erläutert, da sie für diese Arbeit nicht relevant ist.

2.3 Differenzierung des Sklerotoms

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung der intersegmentalen Gefäße im Huhn, in Relation zu den knorpeligen und knöchernen Umgebungsstrukturen. An dieser Stelle wird daher besonders auf die Differenzierung des Sklerotoms, als Ursprung der Wirbelsäule und der Rippen eingegangen.

In der Chorda dorsalis werden einflussreiche Signalgeber für die Entwicklung des Sklerotoms exprimiert. Durch Sonic hedgehog (Shh) beispielsweise wird die Expression des sklerotomalen Markergens *Pax-1* hochreguliert. Dieser Effekt konnte in mehreren Experimenten nachgewiesen werden [15, 20, 43].

Die erste morphologische Veränderung des Sklerotoms ist der epithelio-mesenchymale Übergang (EMT) der Zellen innerhalb der ventromedialen Somitenhälfte (siehe Abb. 4 B).

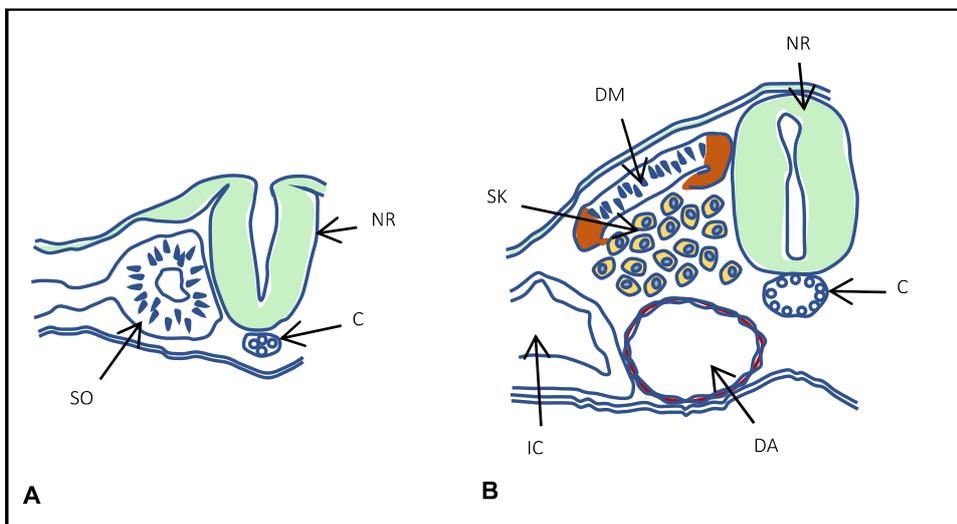


Abbildung 4 Transversalschnitt zur Darstellung der Somiten-Kompartimentierung mit Unterteilung in Sklerotom und Dermomyotom. A: epithelialer Somit; B: Somit mit fortgeschrittener Kompartimentierung; SO = Somit, C = Chorda, NR = Neuralrohr, SK = Sklerotom-Zellen, DA = dorsale Aorta, IC = Intraembryonales Coelom, DM = Dermomyotom (Sadler. Development of somites. Development of Human Skeletal System. https://skeletalsystemdev.weebly.com/uploads/7/0/4/3/7043675/6771853_orig.png (Zuletzt abgerufen am 22.11.2023))

Die Markergene des Sklerotoms, *Pax-1* und *Pax-9*, werden zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert. Die *Pax-1* Expression fördert die EMT, während *Pax-9* erst exprimiert wird, sobald der Übergang stattgefunden hat [44].

Die Abgrenzung des Sklerotoms gegenüber dem Dermomyotom wird durch sich gegenseitig antagonisierende Signale bedingt. Wnt-1, -3a und -4 induzieren die Spezifizierung der dorsalen Somitenhälfte [45] während Shh und Noggin die Bildung des Sklerotoms in der ventralen Somitenhälfte fördern [15, 43, 46, 47].

Fgf8 sowie Shh tragen zur Regulation der Proliferationsaktivität der sklerotomalen Zellen bei [43, 48-50]. Dabei geht die Expression von *Pax-1* mit einer hohen Proliferationsrate der Sklerotomzellen einher [51].

Das Sklerotom wird in Subdomänen unterteilt, die sich durch unterschiedliche Markergen-Expression und ein jeweils anderes Entwicklungsschicksal voneinander unterscheiden.

Die Entwicklung im lateralen Sklerotom ist charakterisiert durch eine Herunterregulierung von *Pax-1* [39], während Fgf8 aus dem Myotom und Bmp4 aus dem Seitenplattenmesoderm wichtige Induktoren des lateralen Sklerotoms sind [52-54].

Aus dem lateralen Sklerotom entstehen die distalen Rippenanteile. Außerdem trägt es mit einer bestimmten Subpopulation von Zellen, dem Syndetom, zur Entwicklung der Sehnen bei [38, 52, 55-57].

Darüber hinaus exprimiert das laterale Sklerotom – kontrolliert durch Bmp4 – VEGFR-2, welches für die Bildung von Endothelzellen der Blutgefäße essentiell ist [58-60].

Das ventrale Sklerotom enthält *Pax-1*-exprimierende Zellen, die die Chorda umwachsen und die Wirbelkörper bilden [37]. Das zentrale Sklerotom liegt etwas dorsolateral davon und enthält Zellen, die zur Bildung der Bogenwurzel, des Querfortsatzes und dem proximalen Anteil der Rippen beitragen. Das dorsale Sklerotom grenzt an das dorsale Neuralrohr an und enthält Zellen, die nach Auswanderung das Neuralrohr dorsal bedecken und die Lamina des Wirbelbogens bilden [61].

Die Proliferation sklerotomaler Zellen wird durch *Pax-1*, *Pax-9*, *Twist* und *Mfh-1* gefördert. Deren Expression wiederum wird durch Shh, Noggin und Fgf8 initiiert [39, 62-69].

Mfh-1 ist ein Gen, das bei der Maus für die Entwicklung von Wirbelkörpern und Bandscheiben benötigt wird [69, 70]. Im Huhn konnte das Homologon dazu, *cFkh1*, nachgewiesen werden. Es wird bereits vor der Somitogenese im paraxialen Mesoderm exprimiert [71]. Im Laufe der Entwicklung beschränkt sich die Expression von *cFkh1* auf das entstehende Sklerotom und bleibt dort bis zum Beginn der Chondrogenese aktiv.

Verschiedene Arbeiten, die sich mit der weiteren sklerotomalen Entwicklung auseinandergesetzt haben, schlussfolgern, dass ein vollständiger Wirbelkörper sowohl aus Anteilen der kaudalen Hälfte eines Sklerotoms entsteht, als auch aus der kranialen Hälfte des nach kaudal folgenden Sklerotoms. Die Zellen des Somitocoels aus dem kranialen Bereich

der kaudalen Sklerotomhälfte bilden Teile der Bandscheiben, während der Wirbelbogen mit Fortsätzen, sowie die proximalen Rippen hauptsächlich aus Zellen der kaudalen Sklerotomhälfte entstehen [57, 72-76].

Diese Resegmentierung hat zur Folge, dass der Bereich zwischen den einzelnen Somiten im Verlauf der Embryonalentwicklung durch die Wirbelanlagen eingenommen wird (siehe Abb. 5).

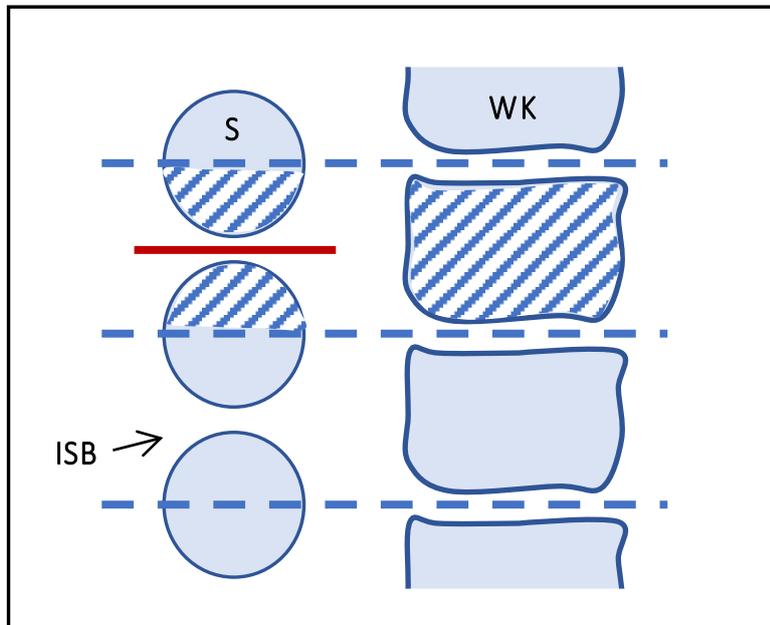


Abbildung 5 Darstellung der Entstehung einer Wirbelanlage aus Anteilen zweier benachbarter Somiten (= S); im frühen Stadium verlaufen die Intersegmentalgefäße (rote Markierung) im intersomitalen Bereich (= ISB); es kommt im Verlauf zur Einnahme des intersegmentalen Bereichs durch den Wirbelkörper (= WK) (Abbildung wurde modifiziert nach: „A resegmentation-shift model for vertebral patterning“ von Ward, Evans, Stern 2017 [77])

Die chondrogene Differenzierung benötigt die Gene *Col2A1*, welches für Typ II Collagen codiert, sowie den Transkriptionsfaktor *Sox9*. Diese Gene werden unter Kontrolle von *Pax-1* und *Pax-9* exprimiert [78-80].

Die *Pax-1* exprimierenden Zellen des Somitocoel sind die einzigen Zellen, die im Verlauf der Somitenentwicklung keine epitheliale Phase durchlaufen [57, 75]. Aus ihnen entstehen die Wirbelgelenke, die Bandscheiben, sowie die proximalen Rippenanteile [57, 72, 73, 75].

Sehnen und Bänder entwickeln sich aus Zellen zwischen dem kranialen und kaudalen Sklerotom, direkt unterhalb des Myotoms, die als Syndetom bezeichnet werden. Diese Zellen exprimieren den spezifischen Sehnen-Marker *scleraxis* [81-83] und werden in diesem Prozess durch *Fgf8*-Signale aus dem Myotom kontrolliert.

Die Entwicklung der Spinalganglien und der Spinalnerven erfolgt in der kranialen Sklerotomhälfte [84]. Zur Wachstumsregulierung dienen Ephrin B1 und B4, die im kaudalen Sklerotom exprimiert werden und die Ausbreitung von Motoneuronen in diesen Bereich des Sklerotoms verhindern, sodass die Spinalnervenwurzeln nur im kranialen Sklerotom nach lateral auswachsen können [85].

Die Meningen des Rückenmarks finden ihren Ursprung ebenfalls im Sklerotom [86]. Dabei wirken Bmp4 Signale aus dem Neuralrohr fördernd und Noggin Signale aus der Chorda hemmend auf die Bildung der Meningen [59]. Der Entwicklungsbeginn wird durch die Expression von VEGFR-2 und Slug eingeleitet und findet, direkt angrenzend an das Neuralrohr, im medialen Sklerotom statt [87, 88].

Das Vorhandensein von VEGFR-2 ermöglicht es außerdem, Endothelzellen und Angioblasten, die Vorläufer der Endothelzellen, zu identifizieren [58]. Man kann sie zunächst in verschiedenen mesodermalen Bereichen, sowie im epithelialen Somiten auffinden und im Verlauf der Entwicklung dann insbesondere im Sklerotom [88].

Aus ihnen entstehen kabel-artige, solide Gefäßstränge, die im Prozess der Tubulogenese durch verschiedene Mechanismen sekundär ein Lumen erhalten. Dabei kann man, kurz gefasst, zwischen extra- und intrazellulärer Lumen-Bildung unterscheiden [89]. Parker et al. haben 2004 beschrieben, dass diese Entwicklung durch Eglf7 reguliert wird [90].

Die VEGFR-2 Expression innerhalb des Sklerotoms wird durch Bmp4 induziert und aufrechterhalten und durch Noggin-Signale herunterreguliert [59].

Zudem ist das Neuralrohr durch die Expression von Bmp4 und VEGFA direkt am Wachstum des perineuralen Gefäßplexus beteiligt [91].

Der Ablauf der Gefäßentstehung wird im nächsten Kapitel ausführlich behandelt. Da sich die folgende Arbeit explizit mit Gefäßen der Embryonalperiode beschäftigt, ist es relevant, die Entstehung dieser Strukturen nachvollziehen zu können.

2.4 Vaskularisierung in der embryonalen Entwicklung

Der Prozess der Gefäßbildung kann in zwei verschiedene Mechanismen unterteilt werden. Die sogenannte „Vaskulogenese“ beschränkt sich auf den Beginn der Embryonalentwicklung. Dabei differenzieren sich Endothelzellen in situ zu Blutgefäßen.

Aus bereits existierenden Gefäßen können kleine Kapillaren aussprossen. Diese Art der Entwicklung wird „Angiogenese“ genannt [92-95].

Die Angiogenese findet auch über die Embryonalentwicklung hinaus statt, beispielsweise im Rahmen der Wundheilung im adulten Organismus. Außerdem kommt diese Art des Gefäßwachstums auch bei der Entstehung von Tumoren und anderen pathologischen Störungen vor, weshalb die Angiogenese nach wie vor ein vielbeforschtes Gebiet ist [96].

Das erste Organsystem, welches im Rahmen der Embryonalentwicklung entsteht, ist das kardiovaskuläre System.

Mit dem Beginn der Somitogenese entwickeln sich sogenannte „Blutinseln“ im viszeralem Mesoderm der Area pellucida und Area opaca. Die Inseln enthalten hämatopoetische Vorläuferzellen sowie Endothelzellen und werden auch unter dem Begriff „Hämangioblasten“ zusammengefasst [97].

Nach Bildung der Hämangioblasten fusionieren die einzelnen Komponenten und entwickeln sich zum primären Gefäßplexus. Aus diesem Gefäßplexus heraus werden die verschiedenen Gewebe und Organe entweder durch Vaskularisierung – wie zum Beispiel die Lungen [92]– oder durch Angiogenese versorgt – hier beispielsweise das Gehirn und die Nieren [98-101]. Experimente mit Frosch-Embryonen haben gezeigt, dass die frühen Abläufe der Vaskulogenese durch Signale der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF) induziert werden [102-104].

Ein prominentes Beispiel für die Vaskulogenese ist die Entwicklung der Aorta [105-109]. Die Aorta wird ursprünglich als bilaterales paariges Gefäß angelegt, welches ab dem zweiten Entwicklungstag auf Höhe der Mittellinie ventral der Chorda dorsalis fusioniert, nachdem die Expression der hemmenden Signalmoleküle Noggin und Chordin herunterreguliert wurde [110].

Das Wachstum von Gefäßsprossen wird durch Induktionsfaktoren eingeleitet, die durch das avaskuläre Gewebe freigesetzt werden. Signalgebend sind beispielsweise Vascular endothelial growth factor (VEGF), als auch Bone morphogenetic protein (Bmp) [111].

Der Angiogenese-Prozess ist bereits intensiv im Zebrafischmodell untersucht worden.

Bei Beginn übernehmen sogenannte „*tip cells*“ [112] mithilfe von hervorstehenden Filopodien die erste Untersuchung der Umgebung, während die sich daran anschließenden „*stalk cells*“ sozusagen die Bausteine der entstehenden Gefäßsprosse sind und eine hohe Proliferationsrate aufweisen [111].

Die „*stalk cells*“ konkurrieren zunächst um die „*tip cell*“-Position. Dabei wirken Signalmoleküle, wie Delta-Notch und verschiedene VE-cadherine, regulierend [113, 114].

Die Bildung von Anastomosen zwischen einzelnen Gefäßen ist Voraussetzung für die Entstehung eines Blutgefäßnetzwerkes. Bisher sind zwei potentielle Anastomose-Möglichkeiten bekannt.

Man unterscheidet den Anastomose-Typ I, bei dem sich die Lumina beider Sprossen unter dem Druck des Blutflusses verbinden [115], und den Anastomose-Typ II, bei dem sich die Sprossen unter geringerem Druck verbinden und die Lumina erst nachträglich entstehen [116]. Verschiedene Adhärenz-Proteine [117], wie das Cdh5/VE-cadherin, sorgen zunächst in beiden Prozessen dafür, dass die Endothelzellen der anastomosierenden Sprossen einen stabilen Kontakt untereinander knüpfen können [115, 118].

Beispielhaft für die Angiogenese ist die Entstehung der Intersegmentalgefäße (ISG) aus der dorsalen Aorta. Der Prozess findet ungefähr zeitgleich statt wie die Fusion der paarigen Hauptschlagader.

Anhand von Studien im Zebrafisch wurde der Ablauf genauer dokumentiert. Die Segmentarterien [95] sprießen dorsal aus der Aorta und wachsen zwischen den Somiten weiter dorsal, bis sie das Neuralrohr erreichen. Dort bilden sie Anastomosen mit den nach kranial und kaudal angrenzenden Segmentarterien [119]. Sobald Gefäße aus der posterioren Kardinalvene (KV) entspringen und mit den Segmentarterien fusionieren, wird eine Verbindung zum venösen System aufgebaut [106].

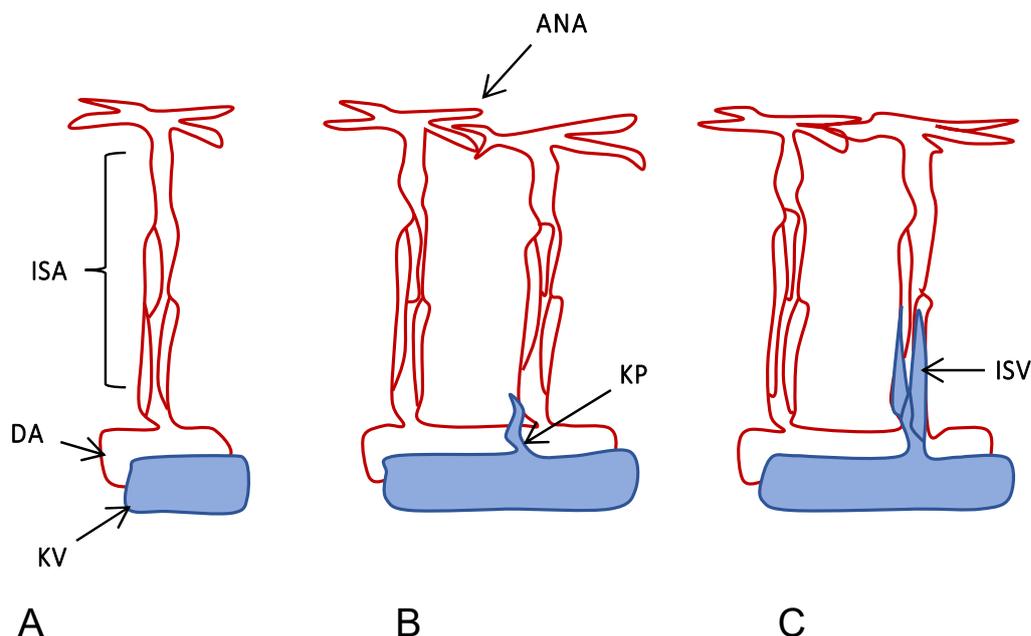


Abbildung 6 Entstehung der Intersegmentalgefäße aus der dorsalen Aorta (siehe A) und Anastomosenbildung nach kranial, kaudal (siehe B) und zur Kardinalvene (siehe C); DA = dorsale Aorta, KV = Kardinalvene, ISA = Intersegmentalarterie, ANA = Anastomose, KP = Kapillare, ISV = Intersegmentalvene (Abbildung wurde verändert nach „Zebrafish Embryo Intersegmental Vessels: A tool for Investigating Sprouting Angiogenesis“ von Chiara Tobia et al 2015 [120])

Das Wachstum der ISG wird durch verschiedene Signale gefördert, bzw. gehemmt [121].

Positive Signale des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor A (Vegf-A) induzieren beispielsweise die Bildung der „tip cells“ [117] während Signale durch *Semaphorin3a* eine hemmende Wirkung erzielen. Darüber hinaus haben Experimente im Maus-Modell gezeigt, dass das Wachstum der ISG stark von der Anwesenheit des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) abhängig ist [122]. VEGF wird wiederum durch das Signalmolekül

Sonic Hedgehog (Shh) reguliert [123-125], dass auf diese Weise ebenfalls eine essentielle Rolle in der Entwicklung der ISG spielt.

Neben der Verbindung von bestehenden Blutgefäßen zu Gefäßnetzen könnten solche Verbindungen sekundär auch wieder getrennt werden. Dazu kommt es, wenn sich die Gefäßnetzwerke beispielsweise an neue Bedingungen anpassen müssen [126, 127]. Die Gefäße werden entfernt, indem die Endothelzellen in die noch bleibenden Gefäße reabsorbiert werden. Diese Schritte laufen durchgehend während der Gefäßentwicklung ab und werden durch den wechselnden Blutfluss reguliert [128].

2.5 Das Haushuhn (*Gallus gallus*) als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie

Schon zu Zeiten von Aristoteles und in der klassischen Embryologie des 19. Jahrhunderts war das Modellsystem Hühnerembryo beliebt für die Untersuchung und das Verständnis der embryonalen Entwicklung [129].

Auch heute noch zählen das heimische Huhn (*Gallus gallus*), sowie die japanische Wachtel (*Cortornix japonicum*) zu den beliebtesten Vogelarten in der Entwicklungsforschung [130].

Im Vergleich zu anderen Tiermodellen erlaubt das Huhn, durch seine Entwicklung *ex utero*, die Beobachtung des Embryos *in vivo* [131, 132].

Ein Großteil des heutigen Wissens über die embryonale Herkunft von Endothel-, Blut- und Herzmuskelzellen lieferten Studien im Vogelmodell [92, 133-137].

Die simple Haltungsform und Bebrütung machen das Huhn zu einem idealen Versuchsmodell. Außerdem ist es durch den einfachen Zugang zum Embryo möglich, die Auswirkung durchgeführter Experimente auf den Organismus, nach erneuter Inkubation, in einem späteren Stadium zu beobachten. Auf diese Weise war es schon in den 1960er Jahren möglich, den Weg verschiedener Zellen nachzuverfolgen, wie beispielsweise die Differenzierung von Neuralleistenzellen [138].

Für die kurzfristige Beobachtung von Zellbewegungen ist es im Hühnerembryo möglich, fluoreszierende Farbstoffe – wie beispielsweise Dil und DiO – einzusetzen. Diese Methode hat sich unter anderem zur Beschreibung der Gastrulation im Huhn als nützlich erwiesen [139].

Mit Blick auf die bereits erwähnten Vorteile, die das Hühner-Modell in der Forschung bietet, habe ich meine unten ausgeführte Fragestellung an diesem Modell durchgeführt. Die unkomplizierte Form der Bebrütung im Inkubator, sowie der einfache Zugang zum Embryo haben sich an dieser Stelle für die Ausführung der Arbeit als besonders nützlich erwiesen. Außerdem gibt es zu dieser Fragestellung für das Huhn bisher noch keine relevanten Daten.

2.6 Wissenschaftliche Fragestellung

Die nachfolgende Arbeit befasst sich mit der Differenzierung der Intersegmentalgefäße im Verlauf der Entwicklung der Wirbelsäule.

Die Bildung der Intersegmentalgefäße, vor allem im Hinblick auf den Einfluss verschiedener signalgebender Moleküle, war bereits Gegenstand früherer Forschungsprojekte. Dabei haben insbesondere Studien im Zebrafischmodell dazu beigetragen, die Entstehung der Intersegmentalgefäße besser zu verstehen [140]. Die bisher durchgeführten Studien beschränken sich auf die molekularen Faktoren, die zur Angiogenese beitragen. Dabei wurde bisher nicht auf die spätere Differenzierung der ISG eingegangen.

Basierend auf dem in Lehrbüchern vermittelten Wissen, besteht die allgemeine Annahme, dass aus den ISG die Interkostalgefäße hervorgehen [141]. Allerdings fehlen bislang noch die experimentellen Daten, um diese Hypothese zu bestätigen. Es müssten unter anderem die Mechanismen und die morphogenetischen Veränderungen der ISG im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung untersucht werden, um den genauen Ablauf einer möglichen Re-Organisation und Interkostalgefäßentstehung aus den ISG nachvollziehen zu können.

In der folgenden Doktorarbeit werden daher drei prioritäre Arbeitshypothesen überprüft.

Die erste Arbeitshypothese nimmt an, dass die Interkostalgefäße direkt aus den ursprünglichen Intersegmentalgefäßen hervorgehen, die während der fusionierenden Wirbelanlagen nach lateral verlagert werden. In ihrem Paper zu den Cervikalforamina in Plesiosauriern erwähnen Wintrich et al. zwar kurz diese Hypothese, allerdings mit dem Einwand, dass man über den genauen Ablauf dieser Entwicklung bis heute noch nicht ausreichend Erkenntnisse habe [142].

Eine zweite Option wäre, dass die Interkostalgefäße im Prozess der Angiogenese als neue Gefäßäste aus den Intersegmentalgefäßen hervorsprossen.

Bei der dritten Hypothese wird angenommen, dass die Interkostalgefäße schon von Anfang an unabhängig von den ISG direkte Abgänge aus der Aorta sind, während die Intersegmentalgefäße sich im Verlauf wieder zurückbilden.

In der vorliegenden Arbeit soll außerdem beschrieben werden, inwieweit sich das Wirbelkörperwachstum auf die Gefäßmorphologie auswirkt. Die Autoren verschiedenster Arbeiten haben bereits beschrieben, dass ein Wirbelkörper aus Bestandteilen zweier benachbarter Somiten entsteht [56, 57, 72, 74, 75, 143, 144]. Dies bedeutet zwangsläufig, dass der intersegmentale Bereich, in dem die Intersegmentalgefäße in frühen Embryonalstadien verlaufen, zu einem späteren Zeitpunkt durch den Wirbelkörper vollständig

eingenommen wird. Dies könnte einerseits bedeuten, dass die Intersegmentalgefäße zum einen entweder ihre Position ändern müssen, wie schon durch Wintrich et al. vorgeschlagen, oder andererseits, dass die Intersegmentalgefäße nicht verlagert werden, sondern vollständig degenerieren.

Beide Varianten sollen in der folgenden Arbeit berücksichtigt werden.

In Anbetracht der hier erläuterten Arbeitshypothesen wird der wahrscheinlich enge Zusammenhang zwischen Intersegmentalgefäß-Differenzierung und Wirbelkörper-Entwicklung deutlich. In dieser Arbeit wird deshalb sowohl die weitere Entwicklung fluoreszenzmarkierter Interkostalgefäße als auch die Entwicklung der Wirbelanlagen anhand von Sox9 Färbungen im selben Embryo untersucht.

3 Material & Methoden

3.1 Hühner, Inkubation (Stadien d3-d8)

Befruchtete *Gallus gallus domesticus* Hühnereier der Firma *Lohmann Dual* aus Dieburg werden in horizontaler Ebene positioniert und in einem Brutschrank von Grumbach bei 37,8°C für mindestens drei Tage inkubiert.

Ab dem dritten Tag werden täglich Eier zur Injektion entnommen.

Die Eier, die noch länger, maximal bis Tag 8, inkubiert bleiben, werden 3 - 4 Mal täglich um 180° gewendet. Dadurch wird verhindert, dass die Eihäute in der weiteren Entwicklung an der Schale kleben bleiben und die Embryonen beim Öffnen der Eierschale verletzt werden.

Tage inkubiert seit Befruchtung	Stadium nach Hamburger & Hamilton
3	HH 14-17
4	HH 18-21
5	HH 22-24
6	HH 25-27
7	HH 28-29
8	HH 29-32

3.2 Öffnen der Eier

In Abhängigkeit von den benötigten Embryonalstadien werden die Eier zwischen den Tagen 3-8 aus dem Brutschrank entnommen.

Das Ei wird in horizontaler Position belassen und in einer Petrischale mit Hilfe von Tupfern stabil gelagert.

Die Eierschale wird einseitig mit einem Streifen Tesafilm abgeklebt. Mit einer 3 ml Spritze werden am breiten Ende des Eies bis zu 3 ml Eiweiß abgezogen, bevor die Schale mithilfe einer Schere oval gefensterter wird.

Man blickt auf den Embryo, der dem Eidotter aufliegt.

Um den hellen Embryo vom ebenso hellen Eigelb hervorzuheben,

kann optional etwas Tinte verdünnt mit 1x PBS unter den Embryo gespritzt werden. Dadurch sind die Strukturen besser erkennbar.

3.3 Injektion ins Herz

Zur Injektion des Embryos muss zuerst vorsichtig die Vitellinmembran eröffnet werden. Dazu gibt man einige Tropfen 1x PBS auf den Embryo, der dadurch absinkt.

Die Vitellinmembran kann optional mit einer Pinzette, oder mit einer Wolframnadel punktiert und soweit aufgezogen werden, dass eine Öffnung entsteht. Dadurch hat man nun Zugang zum Herzen.

Mit Hilfe einer feinen Mikroinjektions-Kapillare wird der fluoreszierenden Farbstoff Dil ins embryonale Gefäßsystem gebracht. Dabei wird die Spitze der Kapillare vorsichtig durch die Herzwand des Embryos gestoßen. Das Dil wird nun über einen an der Kapillare befestigten Schlauch mit Atemluft in die Herzhöhle injiziert und durch die Kontraktionen des Herzens im gesamten Blut-Gefäßsystem verteilt (siehe Abb. 7).

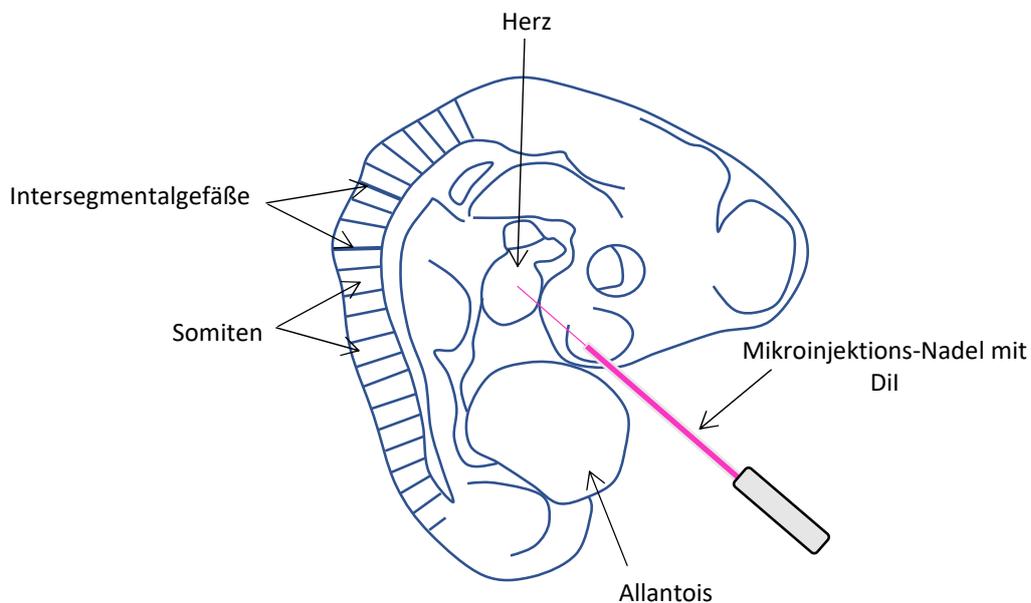


Abbildung 7 Injektion in Herzhöhle bei einem HH20 Wholemount-Embryo (Somiten exemplarisch hellblau markiert, Intersegmentalgefäße exemplarisch fett markiert)

Das Fenster in der Eierschale wird zum Schutz vor Austrocknung mit Tesafilm abgedeckt und die injizierten Embryonen erneut inkubiert. Nach ein bis maximal zwei Stunden wird die Fluoreszenz des Dil in den Gefäßen mit einem Fluoreszenzauflichtmikroskop überprüft.

Dil ist ein lipophiler Farbstoff, der sich nach Injektion in das Gefäßsystem mit den Endothelien der Blutgefäße verbindet [145].

Embryonen, bei denen nach Injektion mit Dil viele Gefäßstrukturen von außen erkennbar sind, insbesondere das Herz, die Gehirnstrukturen, sowie die Gefäße in den Extremitäten, werden als gelungene Injektion gewertet und deshalb isoliert und fixiert.

Dazu durchtrennt man die Area vasculosa mit einer Federschere und überführt den Embryo mithilfe eines Sieblöffels in eine Petrischale mit 1x PBS.

Unter dem Auflichtmikroskop werden mit Federschere und Pinzette die restlichen Bestandteile der Area vasculosa, das Amnion, sowie austretende Gefäße (von dem Embryo) abgetrennt. Optional wird der Embryo decapitiert und schließlich in 4% Paraformaldehyd (PFA) / 1x PBS über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler fixiert. Zur längeren Lagerung hat sich erwiesen, dass das Signal am besten erhalten bleibt, wenn der Embryo nach einem Tag in der Fixierlösung in 1x PBS pH 7,4 überführt wird.

3.4 Präparation der Schnitte

Zur Präparation werden die Embryonen mit dem Rücken nach unten in eine vorgeschchnittene Mulde auf ein 5% Agarose-Gel-Platten gelegt. Die Extremitäten werden seitlich mit kleinen Nadeln festgesteckt (Abb. 8 A).

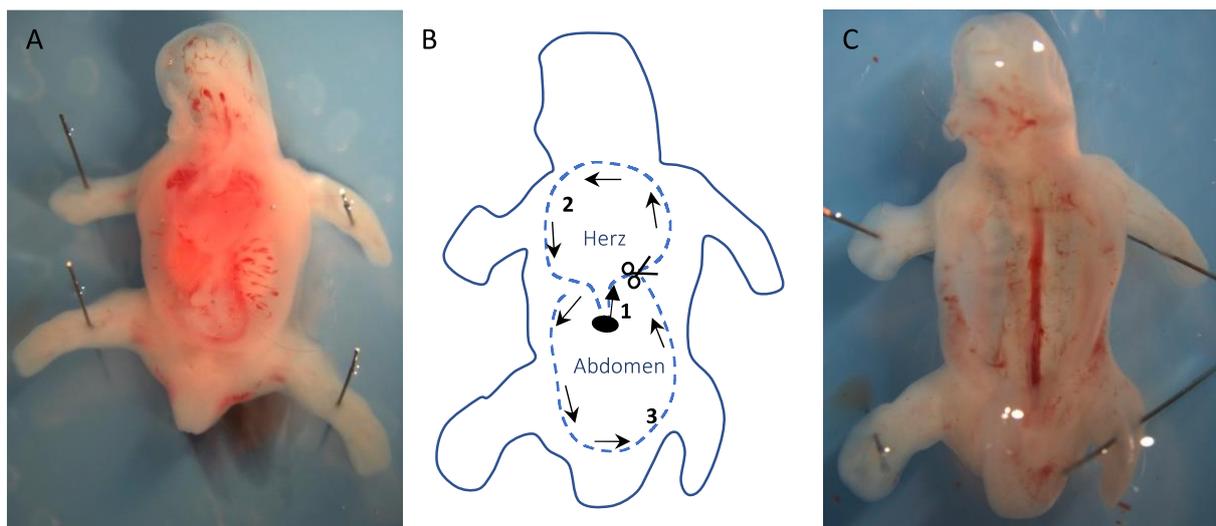


Abbildung 8 Ablauf zur Präparation der Transversalschnitte: A = unpräparierter, decapitierter Embryo, B = Vorgang zur Entnahme der Organe (1-3 = Schnittreihenfolge), C = vollständig präparierter Embryo

Die Federschere (Abb. 8 B) wird dort angesetzt, wo der Nabel austritt (1). Herz (2) und anschließend Abdomen (3) werden gegen den Uhrzeigersinn umschnitten. Das Gewebe wird abgezogen, wodurch die Organe freiliegen. Vorsichtig werden Herz und anschließend Leber und Magen-Darm-Trakt entnommen. Die Nieren, die beidseits der Aorta liegen, werden herausgezupft.

Nun wird, auf Höhe der oberen Extremitäten, der Embryo transversal durchgeschnitten. Der kaudale Teil wird dann in transversale Schnitte zerlegt.

Diese Schnitte werden in thorakal und lumbal eingeteilt, abhängig von ihrer thorakolumbalen Lokalisation (siehe Abb. 9).

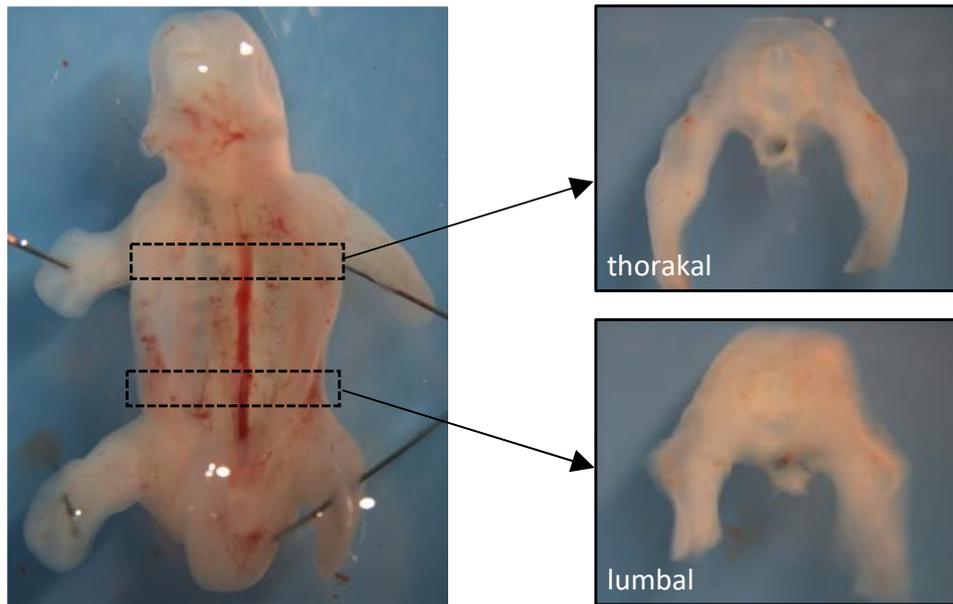


Abbildung 9 Anfertigung der Schnitte mit Einteilung in thorakal und lumbal

Das Fluoreszenz-Signal der einzelnen Schnitte wird unter dem Auflichtmikroskop mit einem 1x Objektiv begutachtet. Die Schnitte, die ein gutes Signal aufweisen, werden fotografiert, dokumentiert und anschließend in eine 96-Well Platte mit 1x PBS überführt und bis zum Beginn der Immunhistochemie (IHC) bei 4° C gelagert.

3.5 Immunhistochemie

Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor der während der Embryogenese in Chondrozyten exprimiert wird [146, 147].

In der folgenden Immunhistochemie werden, mithilfe eines Antikörpers gegen Sox9, in Embryonen unterschiedlicher Stadien die Knorpel-Vorläuferzellen markiert.

Anschließend werden sie mit einem Sekundärantikörper gegengefärbt. So wird die stadienabhängige Rippen- und Wirbelentwicklung dargestellt.

Die Embryonenschnitte wurden über Nacht bei 4° C in 1x PBS gelagert.

1. Permeabilisieren (Ansatz: Hyaluronidase (2mg/ml))

Die Hyaluronidase wird – je nach Anzahl der Schnitte und somit notwendiger Menge – mit 1x PBS verdünnt und auf die Schnitte gegeben

5 ml	Hyaluronidaselösung 2 mg/ml
------	-----------------------------

1 ml	Hyaluronidase (10 mg/ml) 1x PBS
4 ml	1x PBS

30 Minuten	Hyaluronidase-Verdau bei 37° C im Inkubator
30 Sekunden	Mit 0,1% PBST bei Raumtemperatur (RT) auf Schüttler waschen
5 Minuten	Auf Eis mit 0,1% PBST auf Schüttler waschen
10 Minuten	Auf Eis mit 4% PFA in 0,1% PBST auf Schüttler fixieren
30 Sekunden	Mit 0,1% PBST bei Raumtemperatur auf Schüttler waschen
5 Minuten	Auf Eis mit 0,1% PBST auf Schüttler waschen

2. Blockieren (Ansatz: 10% Donkeyserum in 0,1% PBST)

Durch den Blockiervorgang wird eine nicht-spezifische Bindung von Antikörpern oder anderen Reagenzien an das Gewebe verhindert.

Die Blockierlösung wird sowohl für das Blockieren, als auch später für die Inkubation mit dem Primärantikörper benötigt. Daher wird die doppelte Menge angesetzt.

1 ml	Donkeyserum
9 ml	0,1% PBST

90 Minuten	Bei RT mit Blockierlösung auf dem Schüttler blockieren
------------	--

3. Primärantikörperinkubation (Ansatz: Verdünnung in Blockierlösung auf Eis)

Primärantikörper: Sox9 (HPA001758 rabbit 1/250)

Der Primärantikörper wird mit der Blockierlösung aus (2) zu einer Konzentration von 1/250 verdünnt.

5 µl	Sox9
1250 µl	Blockierlösung

Über Nacht	Bei 4° C auf dem Schüttler inkubieren
------------	---------------------------------------

4. Waschen

Nach der Inkubation wird der Primärantikörper abgenommen und bei 4° C gelagert. Er kann mehrfach verwendet werden.

Das Waschen der Schnitte dient dazu, das Hintergrundsignal herauszuwaschen, bzw. abzuschwächen, sodass das Antikörpersignal hervorgehoben wird.

3x 5 Minuten	Bei RT mit 0,1% PBST auf Schüttler waschen
4x 60 Minuten	Bei RT mit 1x PBS auf Schüttler waschen

5. Sekundärantikörperinkubation (Ansatz: 1% BSA in 0,1% PBST auf Eis)

Sekundärantikörper für Sox9: Goat anti Rabbit, Alexa Fluor 488

Der Sekundärantikörper wird zu einer Konzentration von 1/500 verdünnt.

2 µl	GaR 488
1 ml	Volumen AK-Lösung (1% BSA in 0,1% PBST auf Eis)

120 Minuten	Bei RT auf dem Schüttler inkubieren
-------------	-------------------------------------

6. Waschen

Das erneute Waschen dient dazu, das Hintergrundsignal noch stärker abzuschwächen.

3x 5 Minuten	Bei RT mit 0,1% PBST auf Schüttler waschen
Über Nacht	Bei 4° C mit 1x PBS auf Schüttler waschen

7. Am nächsten Tag wird das Signal unter dem Stereomikroskop (Leica M80) mithilfe des GFP-Filters kontrolliert. Die Schnitte werden einzeln fotografiert und die Ergebnisse dokumentiert. Das Okular des Stereomikroskops hat eine 10fache Vergrößerung. Die Einstellung des Objekt-Okular-Abstandes variiert zwischen 0.71 bis 11.5, was zu einer zusätzlichen Vergrößerung führt. Die Fotos werden der LAS Leica Software Version 4.2 aufgenommen und mit Adobe Photoshop CS6 bearbeitet.

Anschließend werden die Schnitte in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen in 4% PFA in 1x PBS überführt und bei 4° C gelagert.

3.6 Einbettung und Vibratom-Schnitte

Um später hochauflösende Bilder der Schnitte machen zu können, werden die zu schneidenden Embryonen in einen Gelatin-BSA-Sucrose-Mix (GBS) eingebettet und nachfolgend am Vibratom in 80-100 µm dünne Schnitte angefertigt. Zum Teil werden dafür ganze Embryonen eingebettet, in anderen Fällen werden bereits vorgefertigte Schnitte verwendet.

Dazu werden, für die erste Schicht, 2 ml des GBS mit 293 µl 37% Formaldehyd gemischt und in ein Einbettförmchen gegeben. Diese müssen bei RT trocknen, bis das GBS fest geworden ist. Man muss es jedoch immer noch eindrücken können (das dauert ca 3 - 4 Stunden).

Währenddessen werden die fixierten Embryonen für 3x 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Anschließend werden sie in reinem GBS equilibriert. Dieser Prozess dauert ca. 3-4 Stunden.

Ist der GBS-Formaldehyd-Mix gelartig geworden, werden die equilibrierten Embryonen (-/Schnitte) daraufgelegt. Überschüssiges GBS wird abgesaugt. Bei ganzen Embryonen wird der Schwanz möglichst gestreckt platziert.

Anschließend werden die Embryonen vollständig mit einer zweiten Schicht aus GBS und 37% Formaldehyd bedeckt.

Die Förmchen bleiben über Nacht abgedunkelt bei Raumtemperatur stehen und härten aus. Zur Lagerung werden die eingebetteten Embryonen bei 4 °C in eine Feuchtkammer gelegt.

Am Vibratom (Leica) werden 80-100 µm dicke Transversalschnitte angefertigt. Die Schnitte werden mit einem Pinsel im 1x PBS aufgefangen und hintereinander angeordnet auf einen Objektträger gegeben.

Sobald der Objektträger voll ist, werden die Schnitte unter einem Mikroskop untersucht. Es werden die Schnitte behalten, auf denen man leuchtende Gefäße erkennt, alle anderen Schnitte werden entsorgt.

Die gesammelten Schnitte werden anschließend mit DAPI (1:1000), einem Zellkern-Marker, und einem Phalloidin Aktin-Marker (1:100) in 1x PBS, 1% BSA auf dem Objektträger für ca 30 Minuten abgedunkelt inkubiert.

Anschließend werden die Schnitte mit einem Deckglas und Prolong Diamond von Thermo Fischer eingedeckt. Dadurch wird sowohl die Fluoreszenz vor Bleaching geschützt, als auch die Schnitte vor Austrocknung bewahrt. Die Objektträger werden mit kleinen Gewichten beschwert und härten abgedunkelt über Nacht bei Raumtemperatur aus.

Die Präparate werden bei 4 °C aufbewahrt.

Die Transversalschnitte können nun unter einem konfokalen Mikroskop, dem LSM 880, mit einem Objektiv mit 20facher Vergrößerung angeschaut und fotografiert werden.

3.7 Reagenzien

1) DiI

CellTracker (C7001)	CM-DiI	in DMF (1mg / ml)	bei -25°C lagern, vor Licht schützen
------------------------	--------	-------------------	--------------------------------------

2) DiO

SP-DiOC18(3) (D7778)		in DMF (1mg / ml)	bei -25°C lagern, vor Licht schützen
----------------------	--	-------------------	--------------------------------------

3) 10x PBS (1 Liter)

1,37 M NaCl	80g	Alles abwiegen und in 800mL H ₂ O lösen, pH-Wert auf 7,4 einstellen, auf
26,8 mM KCl	2g	

101,4 mM Na ₂ HPO ₄	14,4g	1000mL mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren, Lagern bei RT
17,63 mM KH ₂ PO ₄	2,4g	

4) 1x PBS in dH₂O (autoklav.) pH 7,4

10x PBS pH 7,4	100 ml	auf 1000 ml auffüllen mit dH ₂ O
----------------	--------	---

5) 0,1% PBST in dH₂O pH 7,4

10x PBS pH 7,4	100 ml	10 ml 10% Triton X mit dH ₂ O auf insgesamt 900 ml auffüllen; 100 ml 10x PBS hinzugeben; in Becherglas umfüllen, 1-2 Mal mischen
10% Triton X in H ₂ O	10 ml	
dH ₂ O	890 ml	

6) 4% PFA in 1x PBS pH 7,4

Paraformaldehyd	40 g	40g PFA unter Abzug abwiegen, mit ca 800 ml 1x PBS auffüllen und bei 60° C lösen. Abkühlen lassen, auffüllen auf 1000 ml und aliquotieren (lagern bei -20° C)
1x PBS pH 7,4	1000 ml	

7) 4% PFA in 0,1% PBST pH 7,4

Paraformaldehyd	40 g	40g PFA unter Abzug abwiegen, mit ca 800 ml 0,1% PBST auffüllen und bei 60° C lösen. Abkühlen lassen, auffüllen auf 1000 ml und aliquotieren (lagern bei -20° C)
0,1 % PBST pH 7,4	1000 ml	

8) 5% Agarose-Platte zum Stabilisieren der Embryonen beim Präparieren

Agarose	2,5 g	zusammen in Mikrowelle erhitzen, alle 20 Sekunden schwenken, nach Erhitzen die verdampften ml mit dH ₂ O auffüllen, in Petrischale überführen und ca 15 Min aushärten lassen
dH ₂ O	50 ml	

9) Gelatin-BSA-Sucrose-Mix (GBS-Mix)

1x PBS pH 7,4	450 ml	Gelatine abwiegen und mit 5 ml 1x PBS mischen; 445 ml 1x PBS auf 70° C erwärmen und zur Gelatine hinzufügen;
---------------	--------	--

		auf dem Rührgerät die Gelatine in 1x PBS vollständig lösen, danach auf 40° C abkühlen lassen und 135 g BSA portionsweise hinzugeben; ü.N. auf dem Rührgerät lösen; am nächsten Tag 90 g Sucrose hinzugeben und lösen; aliquotieren und bei -20° C lagern
Gelatine	2,2 g	
BSA	135 g	
Sucrose	90 g	

10) GBS Einbettung

GBS	2 ml	Erste Schicht GBS und 37% Formaldehyd gut mischen und in einem Förmchen für 3-4 h semi-fest aushärten lassen, danach eine zweite Schicht mischen
37% Formaldehyd	293 µl	

11) Hyaluronidase-Lösung (2mg/ml)

Hyaluronidase (10mg/ml) 1x PBS pH 7,4	1 ml	Hyaluronidase bei RT auftauen und mit 1x PBS auf 2mg/ml verdünnen
1x PBS pH 7,4	4 ml	

12) Blockierlösung für FIHC mit Sox9 pAK

10% Donkeyserum in 0,1% PBST	1 ml	Donkeyserum bei RT auftauen und mit 0,1% PBST vermischen
0,1% PBST pH 7,4	9 ml	

13) Primärantikörper-Lösung

Sox9 (HPA001758 rabbit 1/250)	5 µl	Sox9 bei RT auftauen, und in Blockierlösung aus Donkeyserum und 0,1% PBST lösen
Blockierlösung	1250 µl	

14) Sekundärantikörper-Lösung

Goat anti Rabbit Alexa Fluor 488	2 µl	Alexa Fluor 488 bei RT auftauen und in Sekundärantikörper-Lösung aus 1% BSA in 0,1% PBST verdünnen
1% BSA in 0,1% PBST	1000 µl	

3.8 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Bijoux-Röhrchen	Sterilin UK
Brutschrank S84	Grumbach
Einweg-Pipetten	BD Falcon
Mehrkanal-Pipetten + Spitzen	Eppendorf
Deckgläschen #1 24x50mm	Menzel
Durchlichtmikroskop	DM 5000 B Leica
Falcon Tubes 15/50 ml	BD Falcon
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2 ml	Sarstedt
Federschere	Geuder
Gefrierschrank 4°C	LK exv 3910 Liebherr medline
Gefrierschrank – 20°C	LGU ex 1500 Liebherr medline
Iridektomieschere	Geuder
Kamera Auflichtmikroskop	DFC 320 Leica
Kamera Durchlichtmikroskop	DFC 450 C Leica
Kanüle 0,8x40mm	Braun Melsungen
Kühlschrank 16°C: Vinotec WKW 1812	Liebherr
Glasfaserlichtleiter	KL 1500 LCD Leica
Objekträger 76x26mm	Engelbrecht
Sutter P-97 Puller	Sutter
Einweg-Petrischalen Plastik (3cm und 10cm)	Sarstedt
Pinzette	Dumont
Skalpell Nr.11	Feather Safety Razor Co. LTD
Schere	Aesculap
Schüttler	120 Heidolph Rotamax
selbstklebendes Paketband	Pro Office
Sieblöffel	Geuder
Spritze 3ml Luer Solo	Braun Melsungen
Mikroinjektions-Nadeln	Science Products

Auflichtmikroskop	M80 Leica
96-Wellplates	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	VWR MiniStar silverline
Tungsten Needle	Zur Herstellung wurden Borosilicate Glass Kapillaren von Sutter Instrument mit einem Falming/Brown Micropipette Puller von Sutter Instrument bearbeitet
Heißluft-Inkubator	Heraeus Instruments

4 Ergebnisse

Die intersegmentalen Gefäße verbinden die embryonale Aorta mit den posterioren Kardinalvenen, dabei verlaufen sie zu Beginn ihrer Entwicklung segmental zwischen den Somiten. Die initiale Aussprossung der Intersegmentalarterien aus der embryonalen Aorta wurde sowohl im Hühnerembryo als auch im Zebrafischembryo bereits genauer untersucht [89, 110, 120].

Allerdings ist über die weitere Entwicklung dieser Gefäße im Wirbeltierembryo bis heute wenig bekannt. Es finden sich beispielsweise nur unzureichende Daten darüber, ob es sich bei diesen Gefäßen lediglich um temporäre Bildungen des Embryos handelt oder ob sie in persistierende Gefäße wie die Interkostalarterien umgewandelt werden. Die bis heute in der Literatur vertretenen Auffassungen [133, 148-151] entbehren bisher einer ausreichenden experimentellen Grundlage.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, das weitere Entwicklungsschicksal der Intersegmentalgefäße im Hühnerembryo experimentell darzustellen und deskriptiv zu analysieren.

Hierzu wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Dil bzw. DiO in das Blutgefäßsystem von Hühnerembryonen aufeinanderfolgender Embryonalstadien injiziert. Auf diese Weise wurden die Gefäße markiert und konnten mithilfe eines Auflichtmikroskops mit Fluoreszenzfiltern über mehrere Embryonalstadien hinweg nachverfolgt werden. Um den Verlauf der Gefäße und deren Entwicklungsdynamik innerhalb des Embryos besser sichtbar zu machen, wurden die Embryonen in jeweils zwei Ebenen (Ebene von Somit 20/21, entspricht Th1/2, direkt kaudal der Flügelanlage, im Folgenden thorakale Ebene genannt; Ebene von Somit 26/27, entspricht L1/L2, direkt kranial der Beinanlage, im Folgenden lumbale Ebene genannt) transversal geschnitten und dadurch die Gefäßentwicklung in transversaler Ebene dargestellt. Da die Entwicklung des Embryos in kraniokaudaler Folge voranschreitet, konnten so innerhalb eines Embryonalstadiums zwei aufeinanderfolgende Phasen der Gefäßentwicklung untersucht werden. Die thorakale Schnittebene stellt dabei eine etwas weiter fortgeschrittene Differenzierungsstufe dar als die lumbale Schnittebene. Es muss aber im Blick gehalten werden, dass auch anatomische Unterschiede zwischen der thorakalen und oberen lumbalen Ebene vorliegen können.

Um die topographischen Beziehungen der markierten Gefäße und damit deren anatomische Identität festzustellen, wurde in denselben Embryonen, in denen die Blutgefäße fluoreszenzmarkiert wurden, die sich entwickelnden Skelettelemente dargestellt. Dazu wurde das Verfahren der Immunhistochemie (nachfolgend mit IHC abgekürzt) angewendet. Mit einem Primärantikörper gegen Sox9, der ein Marker für chondrogene Mesenchymzellen ist

und als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle während der frühen Phasen der Chondrogenese spielt [146, 147], konnten bei den injizierten Embryonen die frühen Knorpelanlagen, insbesondere die der Rippen, dargestellt werden.

In zusätzlichen Versuchen wurden die einzelnen Transversalschnitte am Vibratom noch feiner geschnitten und 80-100 µm dicke Schnitte angefertigt. Ziel war es, die Gefäßverläufe mit hoher Auflösung möglichst genau beurteilen zu können.

Für die Versuche wurden Embryonen unterschiedlichen Alters verwendet. Die Stadieneinteilung wurde anhand des Systems von Hamburger und Hamilton [8] vorgenommen (im Folgenden als HH-Stadien abgekürzt), das die Embryonalentwicklung des Hühnerembryos nach morphologischen Kriterien in 46 Stadien unterteilt. Die Stadien, die sich als besonders wichtig für die Entwicklung der Intersegmentalgefäße beim Hühnerembryo erwiesen haben und daher besonders in dieser Arbeit untersucht wurden, sind die Embryonalstadien HH 19-30.

Um die Entwicklung und den Aufbau des Hühnerembryos besser nachvollziehen zu können, werden nachfolgend zunächst frühe Wholemout-Embryonalstadien (HH 17, 20) schematisch dargestellt.

Anschließend werden die Ergebnisse der Versuche mit den Stadien HH 19-30 anhand von Transversalschnitten vorgestellt und erläutert.

4.1 Vorstellung der Morphologie des Hühnerembryos anhand schematischer Darstellungen früher Stadien

Die Anatomie des Hühnerembryos wird anhand zweier junger Embryonalstadien beschrieben. Dieses dient der allgemeinen Übersicht über die Morphologie des Organismus und zum besseren Verständnis der darauffolgenden Versuchsergebnisse.

In Stadium HH 16/17 ist die Somitogenese noch nicht abgeschlossen. Das Herz liegt in Schlauch-Form vor und die Intersegmentalgefäße (im Folgenden ISG genannt) sind von außen gut erkennbar (Abb. 10 A). Die Nahaufnahmen zeigen den embryonalen Rumpf von dorsal. In dieser Einstellung sind die Somiten erkennbar, die hier noch in ihrer charakteristischen runden Form vorliegen (Abb. 10, B). Zwischen den Somiten ist das in Längsrichtung verlaufende Neuralrohr zu sehen (siehe Abb. 10 B (= N)). Die Blutgefäße wurden mit Dil markiert, sodass man die ISG sieht, die zwischen den Somiten verlaufen (Abb. 10 C). Auf dieser Abbildung sieht es so aus, als verliefen die ISG transversal, obwohl sie in

Wirklichkeit einen bogenförmigen Verlauf von ventral nach dorsolateral haben. Sie bilden medial der Somiten schmale Anastomosen untereinander (Abb. 10 C).

In Stadium HH 20 sind die Extremitätenknospen bereits erkennbar (Abb. 11 B). Die markierten ISG sind nach wie vor von außen zu sehen (Abb. 11 A). Der Embryo ist inzwischen stärker gewachsen und es wurde ein Transversalschnitt angelegt, um einen besseren Überblick über den Verlauf der ISG zu erhalten (Abb. 11 C, D). Man erkennt die ISG, die paarig aus der Aorta abgehen und unverzweigt an der Chorda vorbei nach dorsal ziehen. Sie liegen dem Neuralrohr lateral an (Abb. 11 C). In dieser Ansicht sind die Anastomosen zwischen den ISG nicht erkennbar. Die paarigen Gefäße enden scheinbar „blind“ neben dem Neuralrohr. Die venösen Rückflüsse münden in die paarigen Kardinalvenen beidseits lateral der Aorta (Abb. 11 C, D).

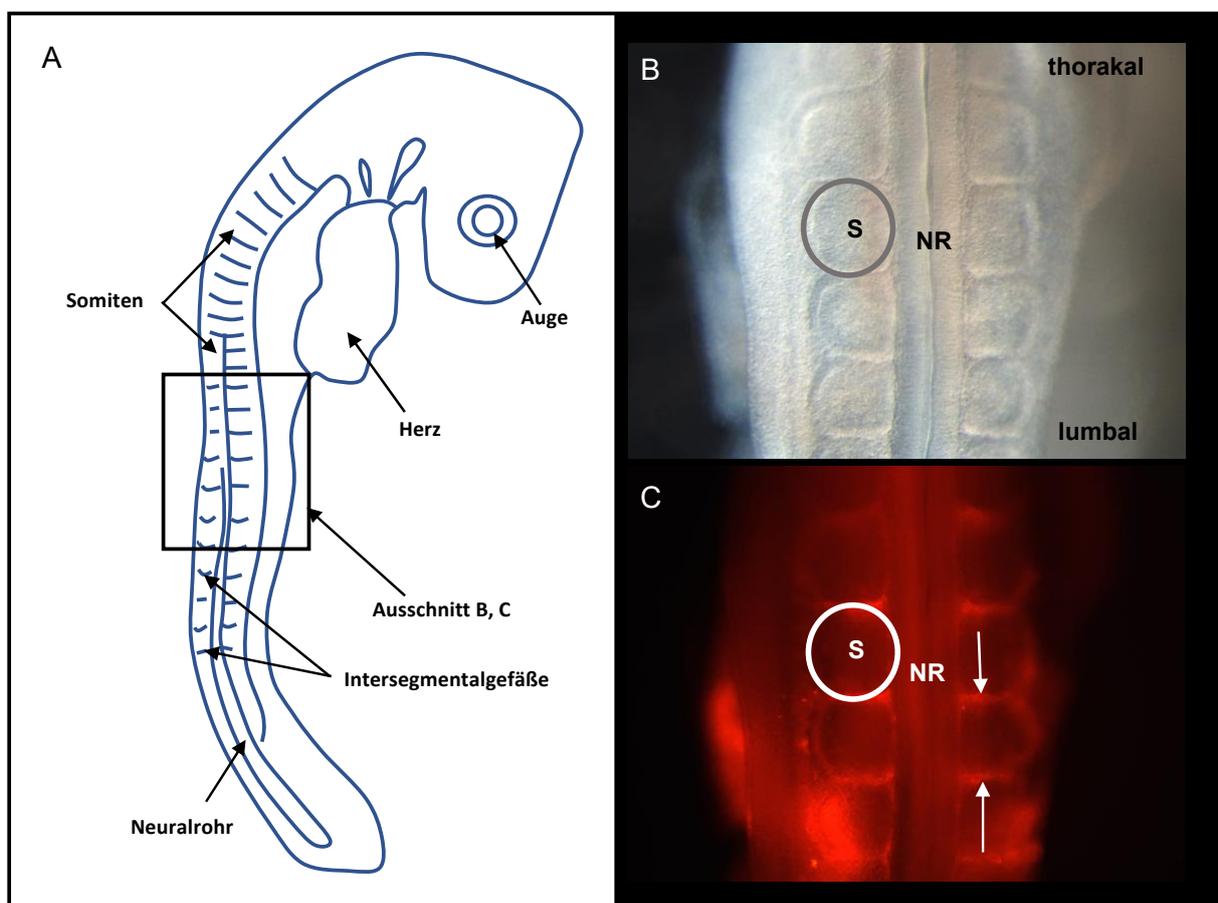


Abbildung 10 Darstellung eines Wholemount-Hühnerembryos in Stadium HH 16/17, sowie dorsale Ansicht der Dil-markierten Intersegmentalgefäße; A: schematische Darstellung eines Embryos in Stadium HH 16/17 von lateral bzw. dorsal (im kaudalen Bereich); man erkennt die für dieses Stadium typischen morphologischen Merkmale (siehe Pfeile); B: Ausschnitt eines Embryos in Stadium HH 16/17 mit Blick von dorsal im Auflicht; man erkennt Somiten (= S) und Neuralrohr (= NR); C: Ausschnitt des gleichen Bereichs; man erkennt die mit Dil markierten Intersegmentalgefäße (siehe Pfeile) die von ventral kommend zwischen den Somiten (= S) nach dorsal verlaufen, dort bilden sie Anastomosen entlang des Neuralrohrs (= NR)

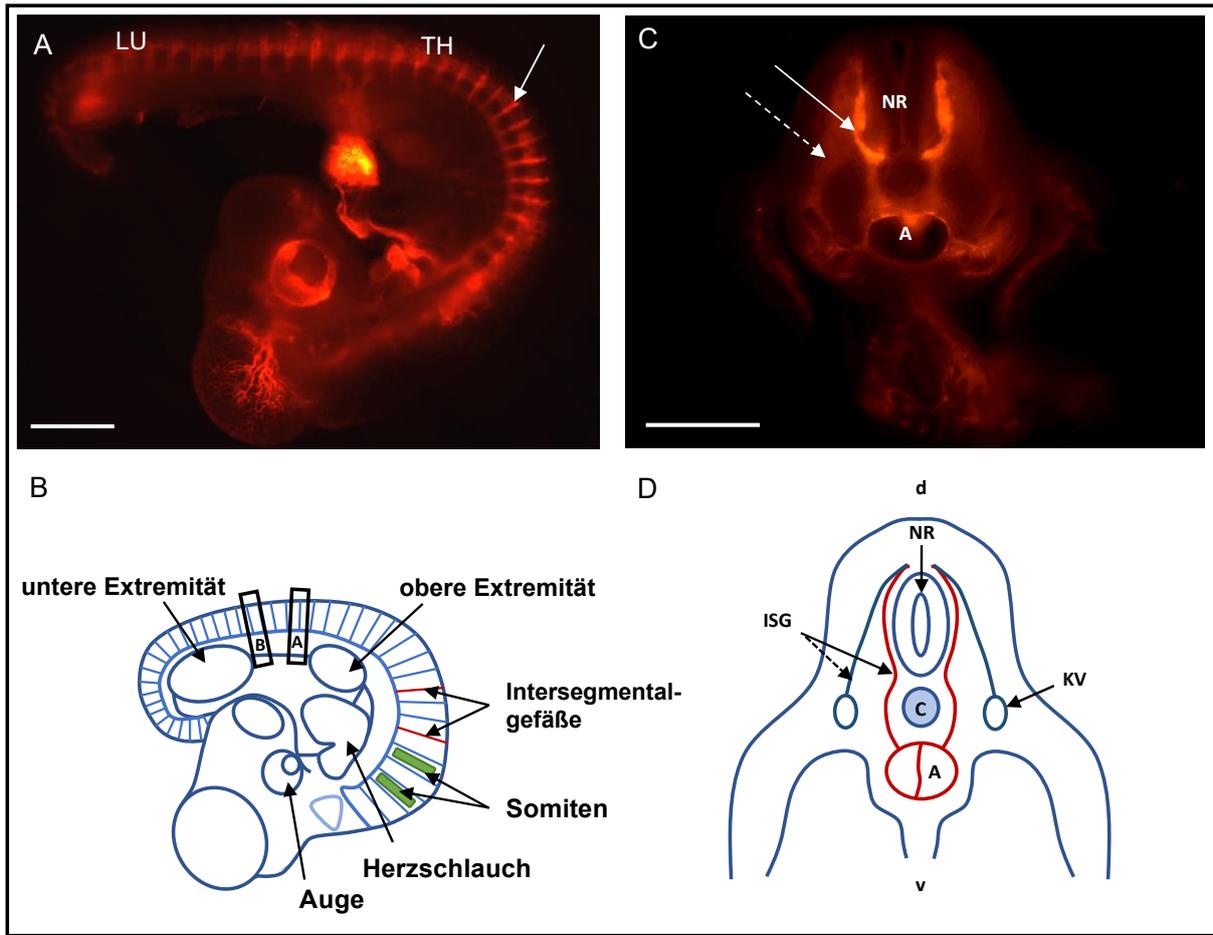


Abbildung 11 Darstellung der mit Dil-markierten Gefäßverläufe und der umliegenden Strukturen im Wholemound, sowie in Transversalebene bei Stadium HH 20; A: Wholemount-Embryo von lateral in Stadium HH 20 nach Dil-Injektion, Pfeil zeigt Intersegmentalgefäß (TH = thorakal, LU = lumbal); B: schematische Darstellung eines Embryo in Stadium HH 20 von lateral, Pfeile zeigen morphologische Strukturen (Intersegmentalgefäße und Somiten exemplarisch farbig markiert) sowie Entnahmestellen der Transversalschnitte (A = thorakale Schnittebene, B = lumbale Schnittebene); C: Transversalschnitt eines Embryo in Stadium HH 20 nach Dil-Injektion, der Transversalschnitt wurde unterhalb der oberen Extremität (= thorakal) entnommen, arterielle Intersegmentalgefäße (siehe durchgehender Pfeil) entspringen der Aorta (= A) und verlaufen nach dorsal, entlang des Neuralrohrs (= NR); parallel dazu verlaufen venöse Intersegmentalgefäße (siehe gestrichelter Pfeil); D: schematische Darstellung des Transversalschnittes aus C (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, KV = Kardinalvene, ISG = Intersegmentalgefäß (arteriell = durchgehend, venös = gestrichelt), d = dorsal, v = ventral) scale bars 1mm

4.2 Morphologische Veränderungen der ISG in Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien

Die Gefäßentwicklung wurde anhand aufeinanderfolgender Embryonalstadien untersucht. Im Rahmen dessen wurden Embryonen der Stadien HH 19 – HH 30 mit Dil injiziert und im Anschluss Transversalschnitte angefertigt (technische Details siehe Material und Methoden). Die Stadien-Einteilung wurde anhand der morphologischen Entwicklung der Embryonen nach Hamburger Hamilton (s.o.) vorgenommen.

Um die Gefäßverläufe anschaulicher darzustellen und besser miteinander vergleichen zu können, wurde jeder Schnitt zusätzlich als schematische Zeichnung dargestellt. Die Zeichnungen der thorakalen und lumbalen Schnitte werden in den Abbildungen 19 und 20 zusammengefasst.

Die morphologischen Veränderungen, die in den Versuchen von besonderem Interesse waren, umfassen die Differenzierung von Aorta und ISG, sowie die Bildung neuer Gefäße in der aus den ISG, insbesondere der *Aa. intercostales*.

Die Abbildungen 12 –14 zeigen die thorakalen Transversalschnitte der Stadien HH 19 – HH 30, die an einer Position unmittelbar kaudal der Flügelanlage entnommen wurden (siehe Schnittebenen in Abb. 12 B).

In den Abbildungen 15 – 17 werden die lumbalen Transversalschnitte aus der Region unmittelbar kranial der Beinanlage der Stadien HH 19 – HH 30 dargestellt.

4.2.1 Morphogenese der Aorta

Die Aorta gehört zu den Strukturen, deren Morphologie sich während der frühen Stadien in besonders hohem Maße verändert. Ihre Entwicklung wurde bereits in der klassischen Literatur beschrieben [151], und wird hier mit den o.g. Fluoreszenzmarkierungstechniken verifiziert. In den thorakalen und lumbalen Schnitten von Stadium HH 19, dem frühesten Stadium das untersucht wurde, liegt die Aorta noch paarig vor (siehe Abb. 12, 15). Sie fusioniert im Rahmen der Entwicklung schrittweise zu einem unpaaren Gefäß. Die Fusion verläuft in kranio-kaudaler Richtung. Die thorakalen Schnitte des Stadiums HH 20 zeigen eine fortgeschrittene Fusion der Aorta, deren Lumen noch von Septen durchzogen wird (N = 13). Währenddessen weisen die lumbalen Schnitte des gleichen Stadiums zum Teil noch paarige Aortae auf (N = 14) (Abb. 15).

In den Stadien HH 20 bis HH 23 schreitet die Fusion der Aortenanlage weiter voran. Es bestehen hier größtenteils noch unvollständig abgebaute Septen, die medial durch die Aorta ziehen (Abb. 12, 13, 15, 16). Die Fusion ist in beiden Schnittebenen ab Stadium HH 24 endgültig abgeschlossen (N = 6) (Abb. 13).

In den späteren Stadien verändern sich vornehmlich die Größenverhältnisse. Die Aorta besitzt zu Beginn der Entwicklung ein, verhältnismäßig, großes Lumen. Im Verlauf wächst das umliegende Gewebe stärker und der Durchmesser der Aorta verkleinert sich relativ zur Umgebung. Dies ist in beiden Schnittebenen gleichermaßen zu beobachten (Abb. 13, 14, 16, 17).

4.2.2 Morphogenese der ISG

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien ist der Abgang der ISG aus der Aorta. In den jungen Stadien entspringen zwei separate, paarige ISG aus der Aorta und verlaufen nach dorsal (Abb. 12, 15). Durch das Größenwachstum von Chorda, Wirbelkörper und anderen skelettalen Strukturen werden die ISG bei ihrem distalen Verlauf entlang der Chorda bzw. der Wirbelanlage relativ nach lateral verschoben, während der Abgang der ISG aus der Aorta nahe der Medianlinie verbleibt.

Der Abgang aus der Aorta unterscheidet sich nicht nur zwischen den Stadien, sondern auch zwischen den beiden Schnittebenen innerhalb desselben Embryos, wobei trotz einiger Variabilität innerhalb der jeweiligen Schnittebenen eine klare Tendenz besteht. In den thorakalen Schnitten der Stadien HH 24 – HH 27 liegen die paarigen Abgänge meist eng beieinander, sodass beide ISG aus einem gemeinsamen Gefäßabgang aus der Aorta hervorgehen, der sich sekundär in die paarigen ISG aufteilt (N = 13) (Abb. 13, 14). Dieser gemeinsame Ursprung der ISG in der dorsalen Medianebene der Aorta wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Im Gegensatz dazu besteht bei den Abgängen der ISG in den lumbalen Schnitten der Stadien HH 26 – 30 ein uneinheitliches Bild. Einige Stadien, wie zum Beispiel HH 24 und HH 25 weisen zum Teil unpaare ISG-Abgänge auf (N = 2). Bei den darauffolgenden Stadien, HH 26 – HH 30 liegen in den lumbalen Schnitten wiederum zwei separate ISG-Abgänge vor (N = 25) (Abb. 16, 17). Dies lässt vermuten, dass die Aortenabgänge insbesondere der weiter kaudal gelegenen ISG recht variabel sind.

4.2.3 Morphogenese der Äste der ISG

Nach unseren Ergebnissen geben die ISG ab den Stadien HH 23 bis HH 24 kleine Gefäßäste zu umliegenden Strukturen ab. Zur besseren Beurteilung dieses wichtigen Entwicklungsschrittes werden diese beiden kritischen Stadien in Abbildung 18 anhand von Nahaufnahmen genau miteinander verglichen. Dies erlaubt einen detaillierten Überblick über die Gefäßmorphologie der ISG.

Die Transversalschnitte in Stadium HH 23 ähneln in ihren morphologischen Eigenschaften weitestgehend den vorherigen Stadien. Man kann eine leichte Größenzunahme feststellen.

Die ISG sind inzwischen annähernd so weit gewachsen, dass die paarigen Gefäße dorsal des Neuralrohrs beinahe miteinander anastomosieren (Abb. 18 B).

Ab HH 24 kommt es zur Abgabe kleiner Gefäßäste aus den ISG. Die Äste entspringen aus den ISG, die lateral des Neuralrohrs verlaufen, und ziehen zur Versorgung des sich entwickelnden Rückenmarks von ventral in das Neuralrohr hinein (N = 6).

Zur Benennung der neu auftretenden Gefäßäste wurde die Terminologie aus der Literatur verwendet [150]. Die Gefäßäste werden in den Abbildungen als *Arteria radicularis ventralis* und *dorsalis* bezeichnet. Der Verlauf der Gefäße kann in den nachfolgenden Versuchsergebnissen mithilfe einer IHC besser eingeordnet werden.

Bei einigen Schnitten im Stadium HH 24 fällt erstmalig das Wachstum kleiner Gefäßäste auf, die auf Höhe der Chorda lateral aus den ISG hervorgehen und nach ventro-lateral ziehen (Abb. 18 D, N = 8). Dass man die Gefäße nicht weiter nachverfolgen kann, könnte durch die Art der Schnitte bedingt sein, die den vollständigen Verlauf der Gefäße nicht erfassen. Es ist allerdings wahrscheinlicher, dass die Äste zu diesem Zeitpunkt tatsächlich noch kurz sind und ihre definitive Länge im Embryo noch nicht erreicht haben. Diese Gefäßäste sind die Anlagen der zukünftigen Interkostalgefäße. Der Verlauf der Gefäße wird weiter unten durch die Ergebnisse der IHC noch klarer dargestellt (Ergebnis Teil 4.3).

Im Rahmen dieser Entwicklungsvorgänge könnte man die Stadien HH 23 und HH 24 als sogenannte „Schlüsselstadien“ bezeichnen, da sie erste prägnante Veränderungen in der Aufzweigung der ISG aufzeigen.

Das Wachstum der Wirbelkörper beeinflusst in diesen Stadien den Verlauf der ISG nach dorsal. Der Wirbelkörper fällt in den Schnitten durch sein Breitenwachstum auf. Da die ISG nach wie vor lateral anliegen, entsteht der Eindruck, als würde der Wirbelkörper von ihnen eingerahmt werden. Durch die IHC zur Darstellung von Sox9 wird dieser Zusammenhang im Ergebnis-Teil 4.3 noch deutlicher, da die knorpeligen Strukturen in den vorausgehenden Versuchen lediglich durch den Verlauf der Gefäße erkennbar werden.

Bei den älteren Stadien ist es möglich, ein fortgeschrittenes Wachstum der Interkostalgefäße (nachfolgend *ICG* genannt) zu beobachten. Sowohl in den thorakalen als auch in den lumbalen Schnitten ist ab Stadium HH 26 erkennbar, dass die neuen Gefäße nach ventral verlaufen. Für eine Beurteilung des Wachstums in Zusammenhang mit den Rippen, werden die Schnitte in den später beschriebenen Experimenten mit Sox9, einem Antikörper gegen ein für die Chondrogenese spezifischen Transkriptionsfaktor markiert (Ergebnis-Teil 4.3).

Ab Stadium HH 26 kommt es zu einer stärkeren Verzweigung der Äste innerhalb des Neuralrohrs (Abb. 13, 16).

In Stadium HH 27 ist erstmals erkennbar, dass die ISG sowohl in thorakalen als auch lumbalen Schnitten weitere Äste nach dorsal abgeben. Diese versorgen die dorsale Haut bzw. Muskulatur und werden in den Abbildungen als *Rami dorsales* bezeichnet (N = 10) (Abb. 14, 17).

Vergleicht man die Differenzierung des Neuralrohrs der Stadien HH 27 und HH 28 mit früheren Stadien, erkennt man an diesem Punkt der Entwicklung bereits Ähnlichkeiten zum adulten Rückenmark (Abb. 14, 17).

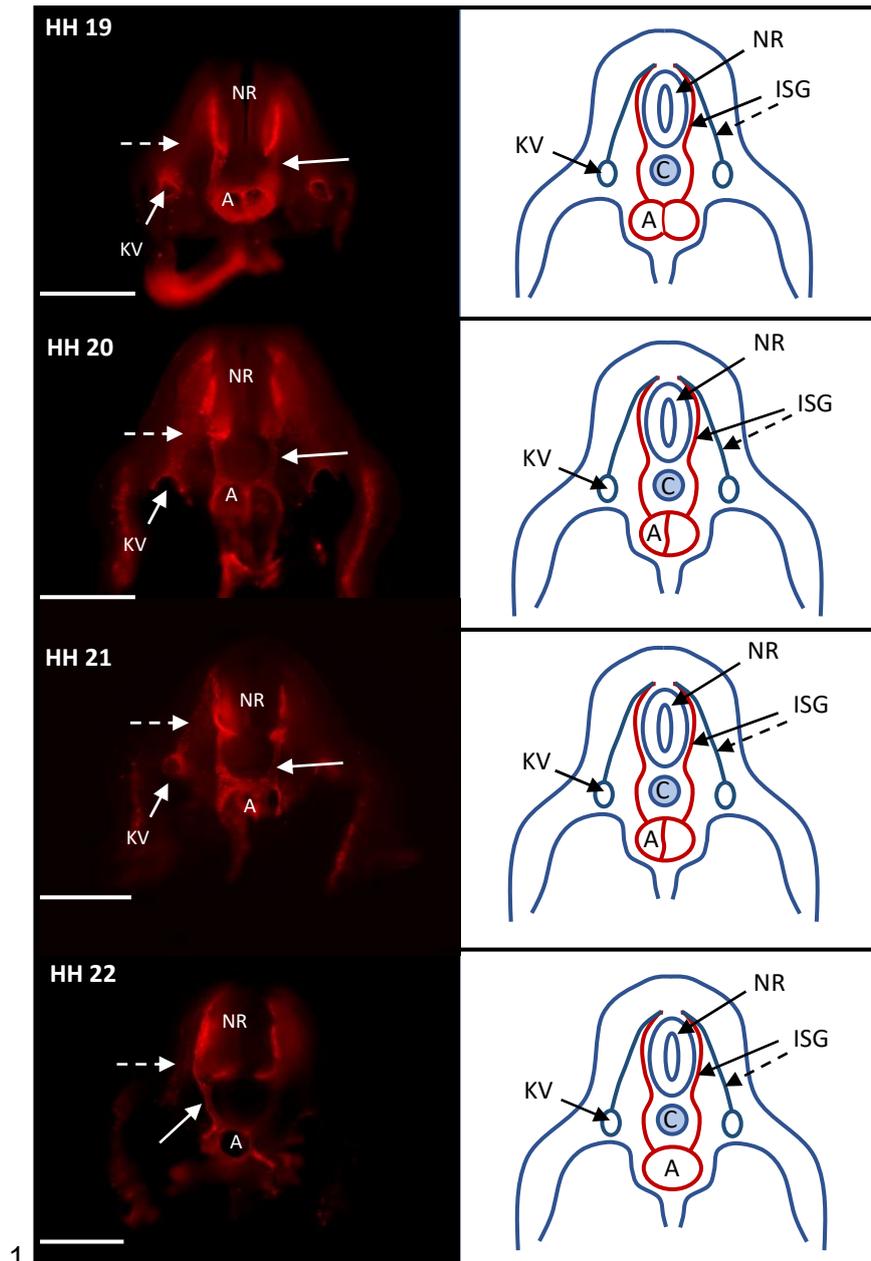


Abbildung 12 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 19 – HH 22 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem thorakalen Bereich: die arteriellen und venösen Gefäßverläufe sind sichtbar, Lichtmikroskop; HH 19: Aorta liegt paarig vor, beide Aortae berühren sich aber bereits in der Medianlinie; HH 20: Fusion der Aorta fortgeschritten, Septum teilt Aortenlumen unvollständig; HH 21: Septum wird langsam abgebaut, ist nicht mehr durchgehend vorhanden; HH 22: Aorta an dieser Stelle vollständig fusioniert (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, ISG = Intersegmentalgefäß, KV= Kardinalvene, durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen venöse ISG) scale bars 500 µm

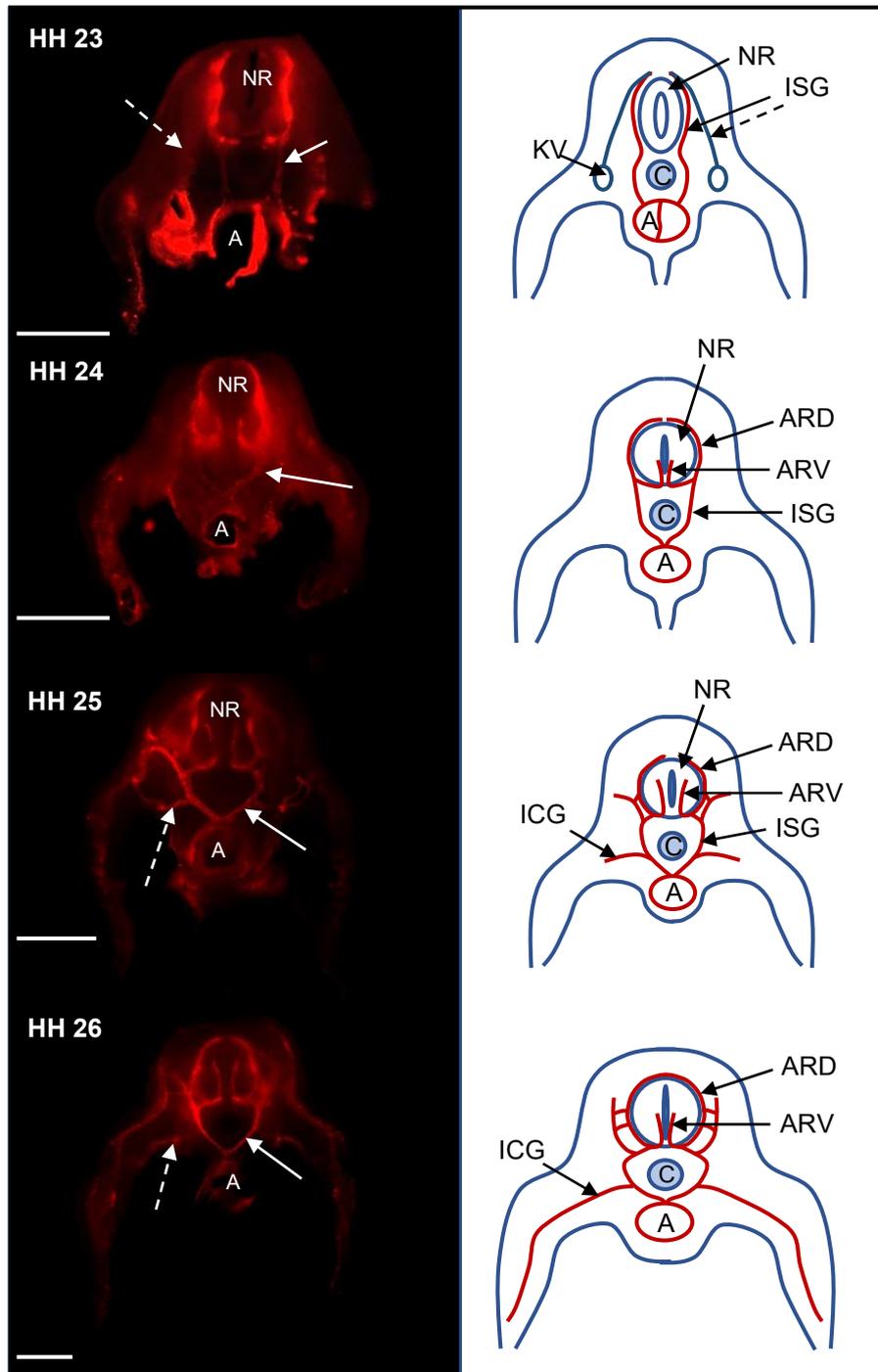


Abbildung 13 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 23 – HH 26 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem thorakalen Bereich: die arteriellen und venösen Gefäßverläufe sind sichtbar, Lichtmikroskop; HH 23: Aorta wird in manchen Schnittebenen noch durch Septen geteilt; HH 24: die Fusion der Aorta ist abgeschlossen, das Neuralrohr wird durch Gefäßäste ARV und ARD versorgt; HH 25: Gefäßast tritt lateral aus ISG aus; HH 26: die Äste zur Versorgung des Neuralrohrs bilden sich weiter aus (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, ISG = Intersegmentalgefäß (durchgehender Pfeil = arteriell, gestrichelter Pfeil = venös), KV = Kardinalvene, ICG = Interkostalgefäß, durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen Interkostalgefäß, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis) scale bars 500µm

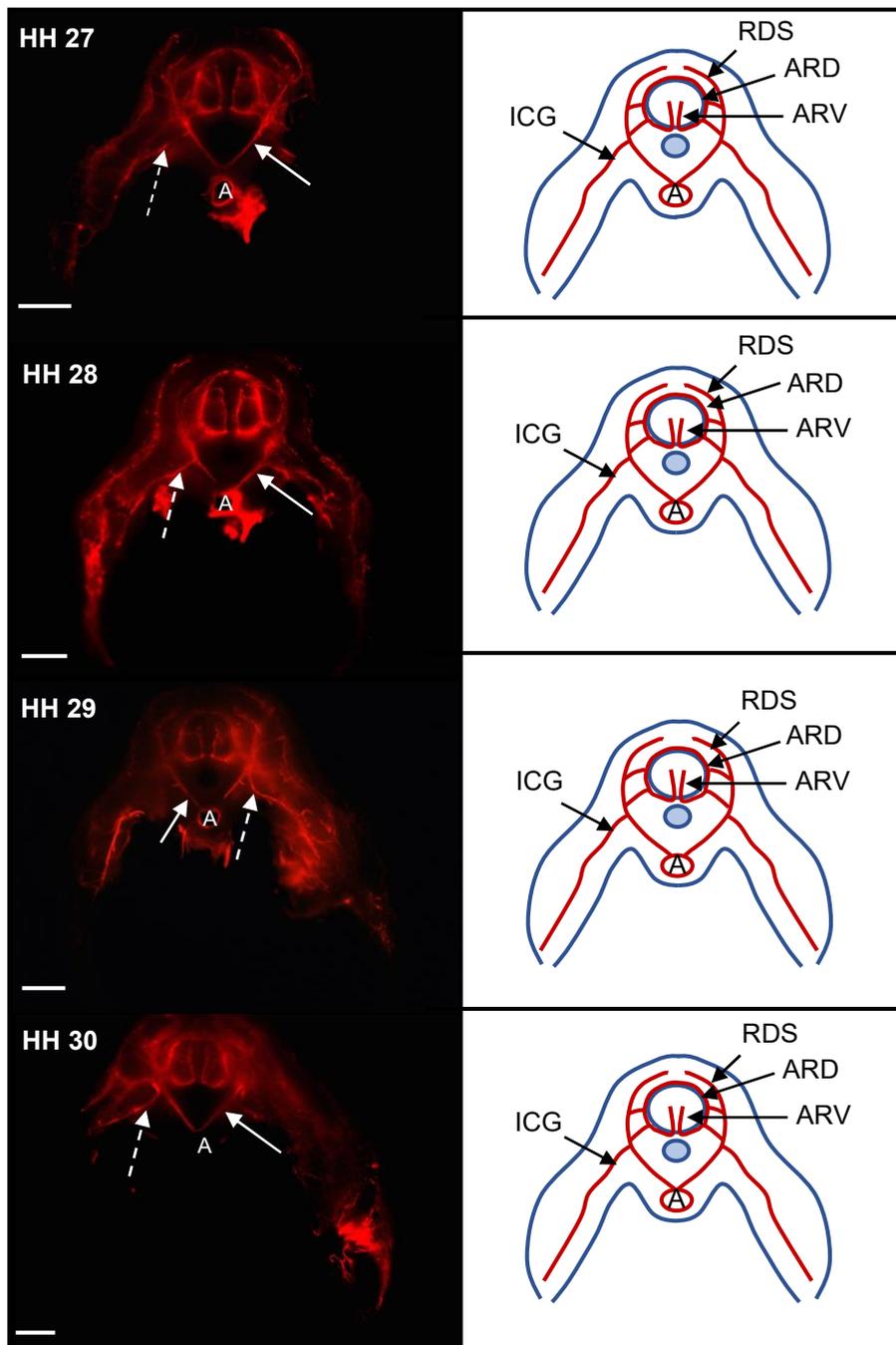


Abbildung 14 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 27 – HH 30 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem thorakalen Bereich: die arteriellen Gefäßverläufe sind sichtbar, Lichtmikroskop; HH 27: Äste zur Versorgung des dorsalen Gewebes ziehen lateral am Neuralrohr vorbei, die Arteriae radicales verzweigen sich innerhalb des Neuralrohrs; HH 28: weitere Differenzierung der einzelnen Äste; HH 29: weiteres Wachstum und Differenzierung der bestehenden Gewebe- und Gefäßstrukturen; HH 30: weiteres Wachstum und Differenzierung der bestehenden Gewebe- und Gefäßstrukturen (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, ISG = Intersegmentalgefäß, ICG = Interkostalgefäß, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, RDS = Ramus dorsalis, durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen Interkostalgefäße) scale bars 500 μ m

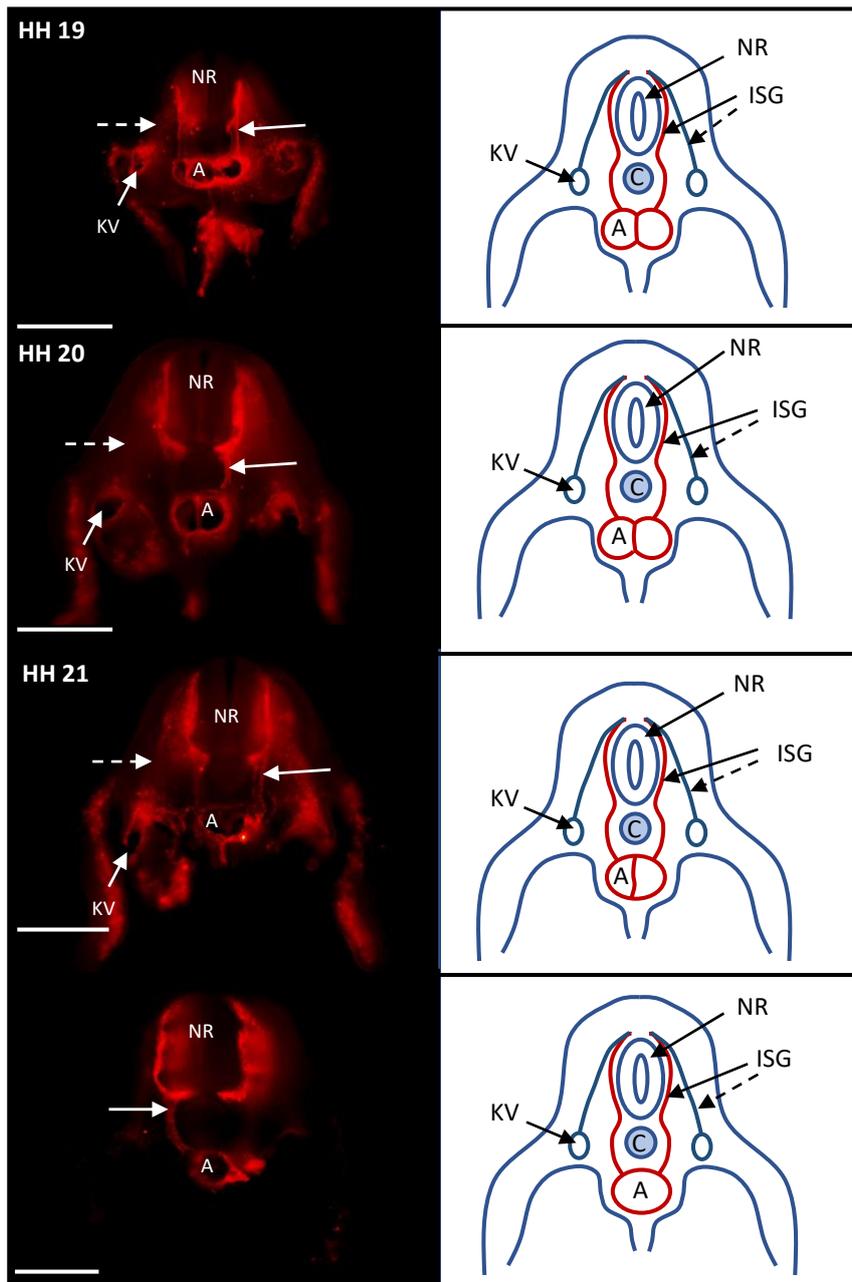


Abbildung 15 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 19 – HH 22 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem lumbalen Bereich: die arteriellen und venösen Gefäßverläufe sind sichtbar, Lichtmikroskop; HH 19: Aorta liegt paarig vor; HH 20: Fusion der Aorta fortgeschritten, Septum teilt Lumen unvollständig; HH 21: Aortenseptum wird schrittweise abgebaut, teilt Aorta nur unvollständig; HH 22: Aorta liegt an dieser Stelle vollständig fusioniert und damit unpaarig vor (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, ISG = Intersegmentalgefäß (durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen venöse ISG, KV = Kardinalvene) scale bars 500 µm

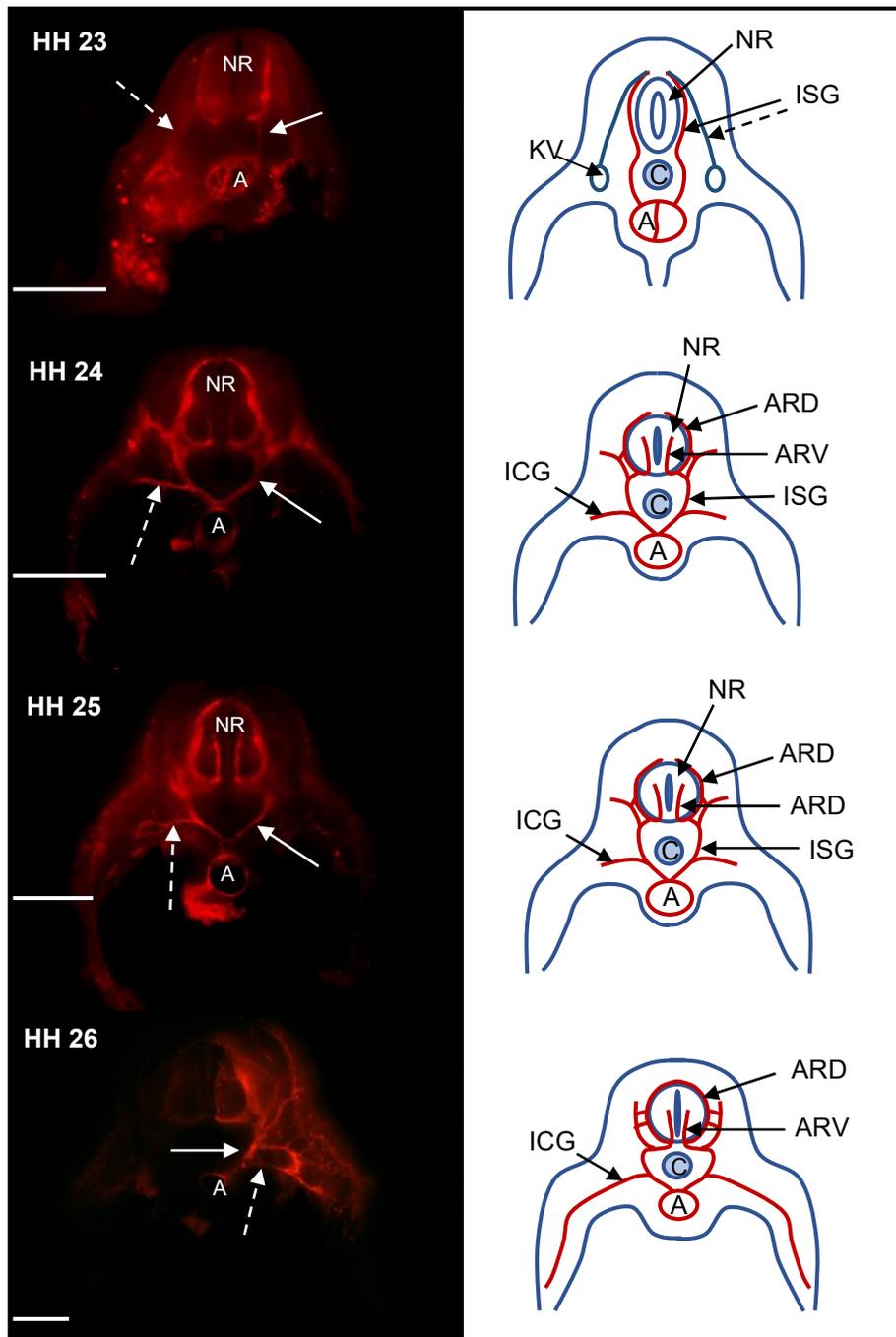


Abbildung 16 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 23 – HH 26 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem lumbalen Bereich: die arteriellen und venösen Gefäßverläufe sind sichtbar, Lichtmikroskop; HH 23: Aorta wird an verschiedenen Stellen noch durch Septen geteilt; HH 24: die Fusion der Aorta ist abgeschlossen, das Neuralrohr wird durch Gefäßäste versorgt, ein einzelnes Gefäß geht lateral aus dem ISG ab HH 25: Gefäßast tritt lateral aus ISG aus; HH 26: Äste zur Versorgung des Neuralrohrs bilden sich weiter aus (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, ISG = Intersegmentalgefäß (durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen venöse ISG), ICG = Interkostalgefäß, durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen Interkostalgefäß; ARV= Arteria radicularis ventralis; ARD = Arteria radicularis dorsalis) scale bars 500 µm

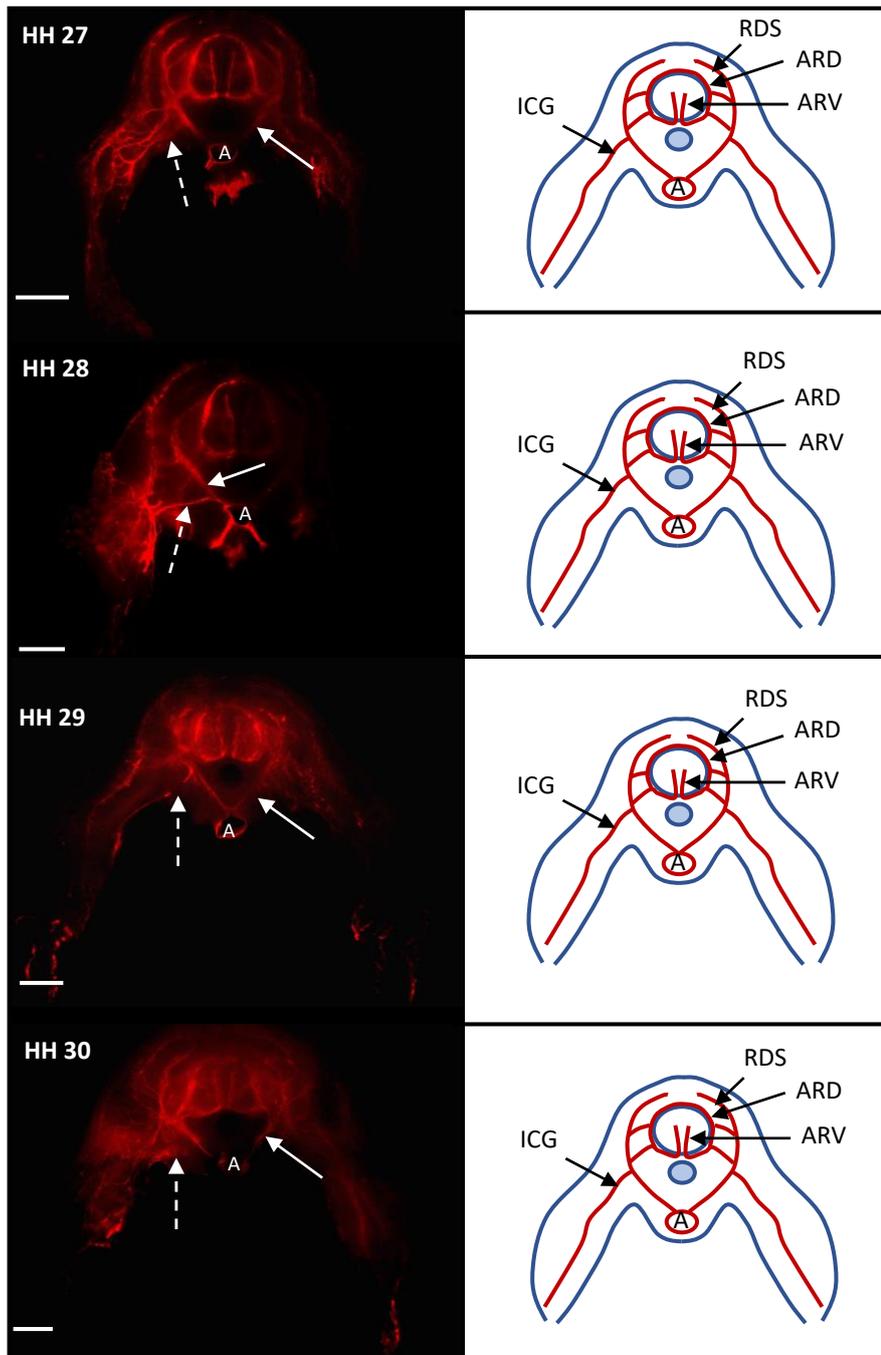


Abbildung 17 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 27 – HH 30 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem lumbalen Bereich: die arteriellen Gefäßverläufe sind sichtbar, Lichtmikroskop; HH 27: Äste zur Versorgung der dorsalen Gewebestrukturen ziehen lateral am Neuralrohr vorbei; HH 28: weitere Differenzierung der Äste; HH 29: weiteres Wachstum und Differenzierung der bestehenden Gewebe- und Gefäßstrukturen; HH 30: weiteres Wachstum und Differenzierung der bestehenden Gewebe- und Gefäßstrukturen (NR = Neuralrohr, C = Chorda, A = Aorta, ISG = Intersegmentalgefäß, ICG = Interkostalgefäß, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, RDS = Ramus dorsalis, durchgehende Pfeile zeigen arterielle ISG, gestrichelte Pfeile zeigen Interkostalgefäße) scale bars 500 μ m

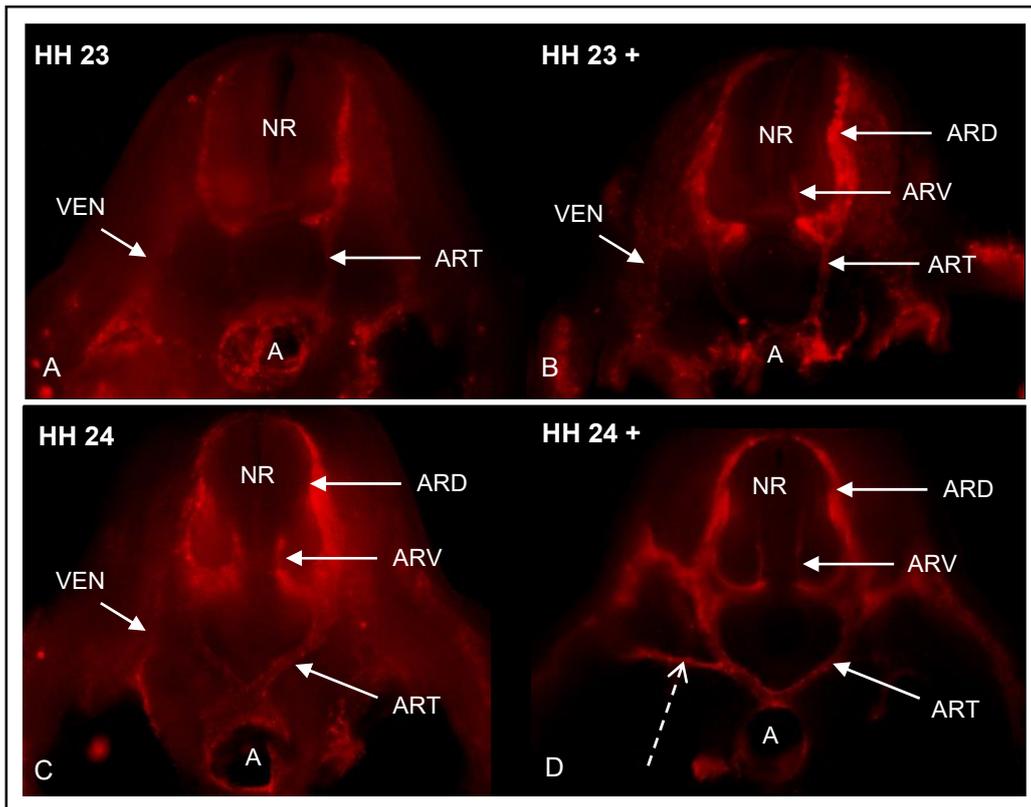


Abbildung 18 Naheaufnahmen der Stadien HH 23 und HH 24 aus dem lumbalen Bereich (+ = Entwicklung ist in gleichem Stadium schon weiter fortgeschritten, die morphologischen Merkmale schließen Zugehörigkeit zu einem älteren Stadium allerdings noch aus): Dil-markierte Transversalschnitte, arterielle und venöse Gefäßverläufe sind erkennbar, Lichtmikroskop; A (Stadium HH 23): morphologische Details haben sich im Vergleich zu den jüngeren Stadien kaum verändert; B (Stadium HH 23+): erstmalig zieht ein Ast zur Versorgung in das Neuralrohr ein, vermutlich artefaktbedingt ist hier nur ein Ast zu sehen; C (Stadium HH 24): beidseitige Versorgung innerhalb des Neuralrohrs; D (Stadium HH 24+): Gefäßast entspringt den ISG und zieht nach lateral, venöse ISG sind nicht mehr erkennbar (gestrichelter Pfeil zeigt Gefäßast) (NR = Neuralrohr, A = Aorta, ART = arterielle ISG, VEN = venöse ISG, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis)

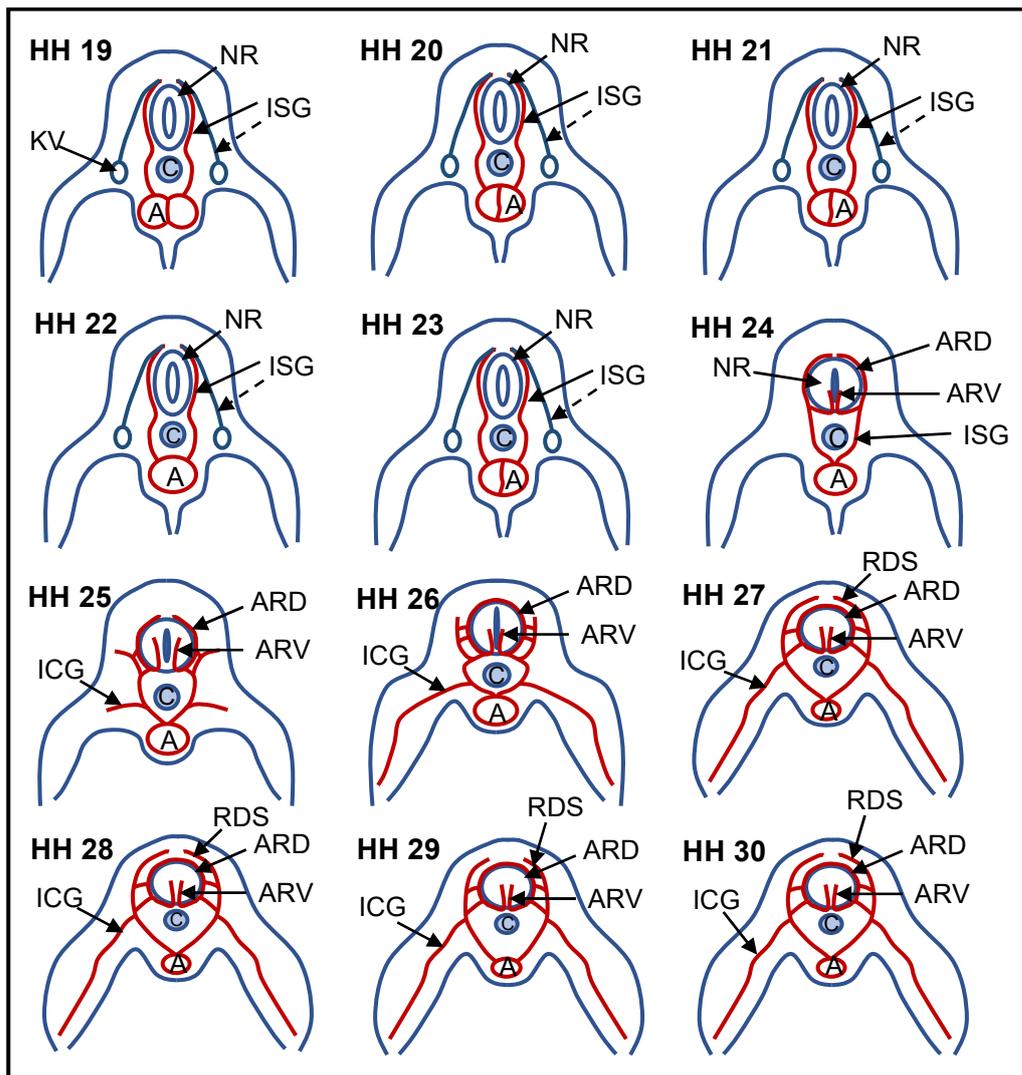


Abbildung 19 Schematischer Überblick der Transversalschnitte aus dem thorakalen Bereich der Stadien HH 19 – HH 30: man sieht die Gefäßverläufe in Zusammenhang mit den unmittelbaren morphologischen Strukturen; HH 19 – HH 23: innerhalb dieser Stadien findet ein Größenwachstum statt, morphologische Eigenschaften sind stadienübergreifend; HH 24: Stadium zeigt erste Veränderungen im Gefäßverlauf der ISG, die Äste zur Versorgung des Neuralrohrs abgeben; HH 25 – HH 26: die ISG geben laterale Gefäßäste ab, vermutlich zur Versorgung der Interkostalbereiche; HH 27 – HH 30: die ISG geben erstmals Äste nach dorsal ab, zur Durchblutung des dortigen Gewebes (NR = Neuralrohr, KV = Kardinalvene, A = Aorta, C = Chorda, ISG = Intersegmentalgefäße (durchgehende Pfeile = arteriell, gestrichelte Pfeile = venös, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, ICG = Interkostalgefäß, RDS = Ramus dorsalis)

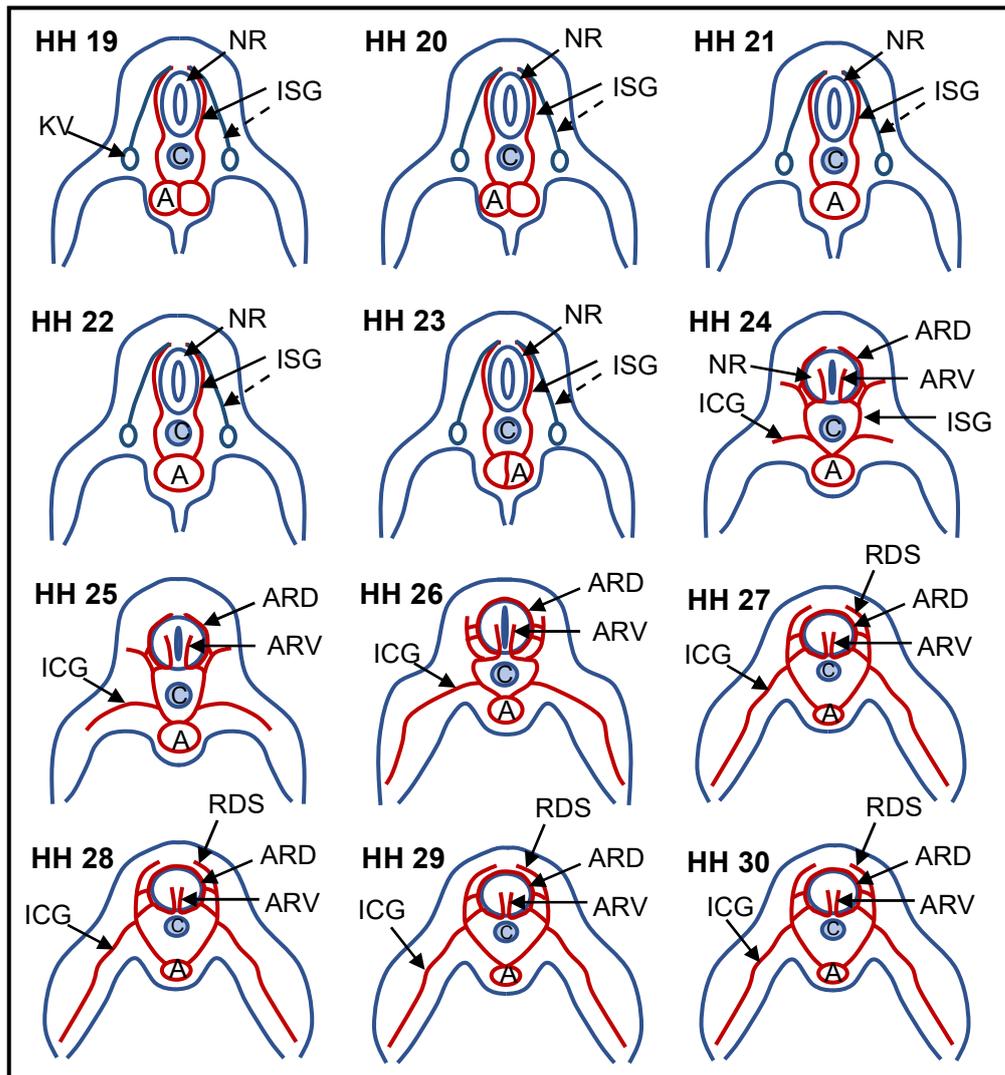


Abbildung 20 Schematischer Überblick der Transversalschnitte aus dem lumbalen Bereich der Stadien HH 19 – HH 30: man sieht die Gefäßverläufe in Zusammenhang mit den unmittelbaren morphologischen Strukturen; HH 19 – HH 23: innerhalb dieser Stadien kommt es vor allem zum Gefäßwachstum, morphologische Eigenschaften sind stadienübergreifend; HH 24 – HH 26: Stadien zeigen erste Veränderungen im Gefäßverlauf der ISG; ISG geben Äste zur Versorgung des Neuralrohrs ab, sowie Äste zur Versorgung der Interkostalbereiche; HH 27 – HH 30: ISG geben erstmals Äste nach dorsal ab, zur Durchblutung des dortigen Gewebes; es besteht außerdem eine Diskrepanz zwischen dem ISG-Austritt aus der Aorta: die Stadien HH 28 und HH 30 weisen beide zwei paarigen ISG-Abgänge auf, während die ISG bei HH 29 unpaar aus der Aorta abgehen (NR = Neuralrohr, KV = Kardinalvene, A = Aorta, C = Chorda, ISG = Intersegmentalgefäße (durchgehender Pfeil = arteriell, gestrichelter Pfeil = venös, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, ICG = Interkostalgefäß, RDS = Ramus dorsalis)

4.3 Vergleichende Versuchsergebnisse der Dil-Injektion und Immunhistochemie gegen Sox9

In Ergebnis-Teil 4.2 wurde die Entwicklung neuer Gefäße und deren Verlauf beschrieben. Der direkte Bezug der Gefäße zum skelettalen System wurde dabei noch nicht berücksichtigt.

Nachfolgend werden daher die Ergebnisse der Dil-Injektion von Blutgefäßen ausgewählter Stadien mit der Darstellung der relevanten Skelettelemente anhand von immunhistochemischer Markierungen (nachfolgend IHC genannt) von Sox9 im jeweils selben Embryo miteinander in Zusammenhang gesetzt und vorgestellt.

Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor, der in den frühen Prozessen der Chondrogenese verschiedene Gene zur Proliferation von Chondrozyten aktiviert [146, 147]. Durch IHC gegen Sox9 können daher Strukturen im Embryo markiert werden, in denen sich Progenitorzellen für knorpelige Strukturen befinden. Damit kann der Verlauf der Gefäße direkt in Bezug zum knorpeligen Skelett gesetzt und somit die topographischen Verhältnisse der Gefäße analysiert werden. Dabei liegt der Fokus vor allem auf der Entwicklung von Wirbelkörper und Rippen, die durch ihre Nähe zu den embryonalen ISG bei der räumlichen Einordnung wichtig sind.

Die Ergebnisse der Sox9-Markierung werden anhand ausgewählter Beispielstadien vorgestellt. Die Transversalschnitte werden an diesem Punkt nicht mehr in thorakal und lumbal eingeteilt, da in diesen Stadien keine Unterschiede erkennbar sind sodass sowohl thorakale als auch lumbale Schnittebenen ohne weitere Kennzeichnung abgebildet werden (Abb. 21). Jede Abbildung wird durch eine schematische Darstellung ergänzt, welche die Synthese der Dil- und IHC-Ergebnisse zeigt.

4.3.1 Sox9-Versuchsergebnisse der Stadien HH 20, HH 21

Die Ergebnisse der IHC gegen Sox9 bei jungen Stadien (hier HH 20, 21) zeigen Sox9-positive Knorpervorläuferzellen vorwiegend im Bereich um die Chorda (N = 5) (Abb. 21). Es handelt sich um Zellen vorwiegend des ventralen Sklerotoms, die das Anlagematerial der Wirbelkörper bilden. Im Transversalschnitt ist erkennbar, dass sich die Progenitorzellen nach lateral und medial, vor allem zur Chorda hin, ausbreiten (Abb. 21 B, E). Im Rahmen der Resegmentierung wandern die Zellen auch in den intersegmentalen Spalt. Bei der Überlagerung der Sox9- und der Dil-Färbungen wird deutlich, dass die Gefäße durch die Progenitorzellen hindurch nach dorsal wachsen, sie befinden sich somit im Sklerotom. Einschränkend muss hierbei erwähnt werden, dass Längsschnitte, die den Resegmentierungsprozess klar zeigen würden, leider nicht vorliegen.

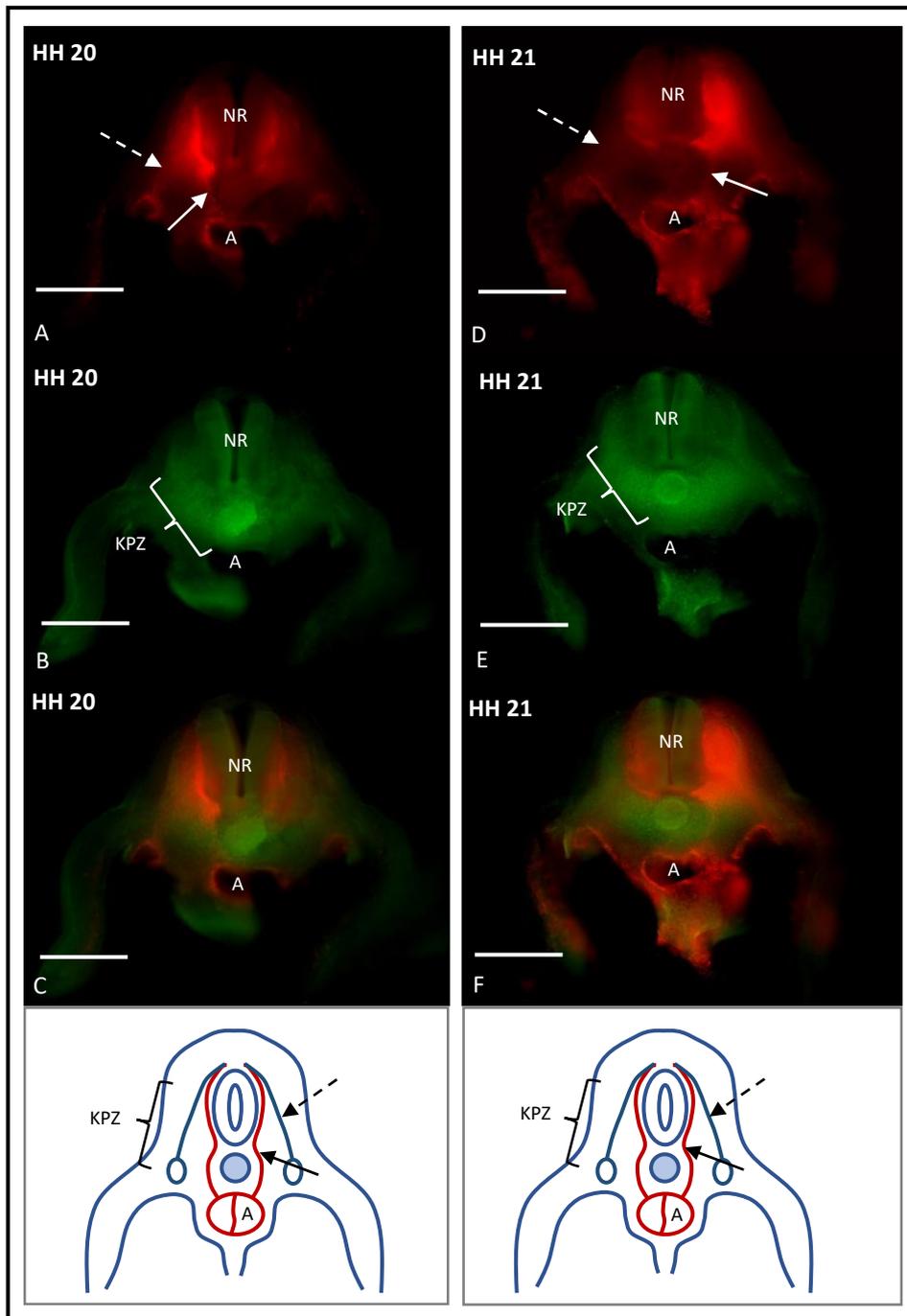


Abbildung 21 Ergebnisse der Dil-markierten Gefäße, sowie IHC der Knorpelprogenitorzellen bei Transversalschnitten der Stadien HH 20, HH 21, Lichtmikroskop; A: Transversalschnitt von Stadium 20 nach Dil-Injektion; B: Transversalschnitt des gleichen Stadiums nach IHC gegen Sox9, die knorpeligen Vorstufen leuchten grün; diese Zellen verdichten sich insbesondere um die Chorda herum; C: Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse; D: Transversalschnitt von Stadium HH 21 nach Dil-Injektion; E: Transversalschnitt des gleichen Stadiums nach IHC gegen Sox9; das intensive grüne Signal um die Chorda zeigt, dass sich hier die meisten Zellen ansammeln; F: Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse; Zeichnungen zeigen Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse (NR = Neuralrohr, A = Aorta, durchgehender Pfeil zeigt arterielles ISG, gestrichelter Pfeil zeigt venöses ISG, KPZ = Knorpelprogenitorzellen) scale bars 500 µm

4.3.2 Sox9-Versuchsergebnisse der Stadien HH 26 – HH 30

Die Versuchsergebnisse der Dil-Injektion bei den älteren Stadien (HH 26 – HH 30) haben gezeigt, dass die Differenzierung der ISG zur Entstehung folgender Gefäßabgänge führt: *Ramus intercostalis*, *Arteria radicularis ventralis* und *dorsalis* (im Folgenden als *Aa. radicales* zusammengefasst), *Ramus dorsalis* (siehe Ergebnis-Teil 4.2). Diese Terminologie soll im Folgenden anhand der Beziehungen der Gefäße zu den Sox9-positiven Wirbelanlagen verifiziert werden.

In der Sox9-IHC der Stadien HH 26 bis HH 30 erkennt man die Sox9-positiven chondrogenen Progenitorzellen. Diese sind inzwischen so angeordnet, dass sie bereits der Form von Rippenfortsätzen und Wirbelkörpern im adulten Organismus ähneln (N = 28) (Abb. 22 B, E, H).

Die Überlagerung von Dil- und IHC-Ergebnissen hilft bei der räumlichen Einordnung der Gefäßäste, die von den ISG abgegeben werden.

Der *Ramus intercostalis* entspringt lateral aus den ISG und verläuft anschließend ventromedial entlang der Rippenfortsätze (Abb. 22 C, F, I). Dieser Verlauf kann bei den älteren Stadien (HH 27, HH 28) beinahe bis zur distalen Spitze der Rippenfortsätze nachvollzogen werden (Abb. 22 F, I).

Nahaufnahmen des Stadiums HH 28 veranschaulichen zudem den proximalen Abgang und Verlauf dieser Äste (N = 8). Der Abgang erfolgt, wie schon im Ergebnis-Teil 4.2 beschrieben, auf Höhe der Chorda (Abb. 24 C, G). Unter Abgabe kleinerer Äste, die um die Rippen ziehen, verläuft der *Ramus intercostalis* in direkter Nähe zur embryonalen Rippe nach ventral. Die Vermutung liegt demnach nahe, dass die Interkostalgefäße in der Embryonalphase zunächst ventral der Rippen verlaufen und im Rahmen der weiteren Entwicklung und Wachstum des Organismus, an den kaudalen Rippenrand verlagert werden. Das ist der Bereich, in dem man die Gefäße im adulten Organismus vorfindet. Um das zu verifizieren, müssten noch ältere Stadien untersucht werden, was im Rahmen dieser Studie nicht möglich war.

Die *Arteriae radicales* weisen in den älteren Stadien eine stärkere Verzweigung innerhalb des Neuralrohrs auf. Dies betrifft alle Stadien von HH 26 bis HH 30 (Abb. 22, 23). Anhand der Nahaufnahmen (Abb. 24) kann man zudem erkennen, dass die ISG am ventralen Ende des Neuralrohrs zwei Äste abgeben, die *Arteria radicularis ventralis* und die *Arteria radicularis dorsalis*. Diese beiden Äste übernehmen dann die vollständige Versorgung des Neuralrohrs mittels weiterer *Rami radicales* (Abb. 24 A, E).

Nach Abgabe der *Arteriae radicales* zieht das ISG lateral am Neuralrohr vorbei und endet dorso-medial von Neuralrohr und Wirbelkörper als *Ramus dorsalis* (Abb. 22 A, D, G, 23 A, D, G, 24 A, E).

Die Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse zeigt an dieser Stelle, zumindest bei der hier verwendeten Auflösung und den vorliegenden Stadien, dass keine weiteren Äste zur Versorgung der chondrogenen Strukturen abgegeben werden (Abb. 15 C, F).

Wie bereits erläutert, sind die chondrogenen Strukturen in diesen Stadien bereits so weit differenziert, dass Wirbelkörper und Rippen vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden können (siehe Abb. 22, 23, 24). Im Rahmen der Resegmentierung wird der Bereich, in welchem die ISG verlaufen, innerhalb der Stadien HH 25 – HH 30 schrittweise durch den embryonalen Wirbelkörper eingenommen. Dabei müssen sich die ISG an diese topographischen Veränderungen anpassen. Betrachtet man den Verlauf der ISG in Stadium HH 21 und in HH 30 (siehe Abb. 25), kann man erkennen, dass die Gefäße durch das Wachstum der chondrogenen Strukturen gleichsam nach lateral verschoben werden (Abb. 23, HH 30). Man kann daher davon ausgehen, dass die Gefäße in den Stadien HH 26 – HH 30 in den Zwischenräumen von Wirbelkörper und Rippen verlaufen und sich somit zunächst in den intersegmentalen Bereichen befinden.

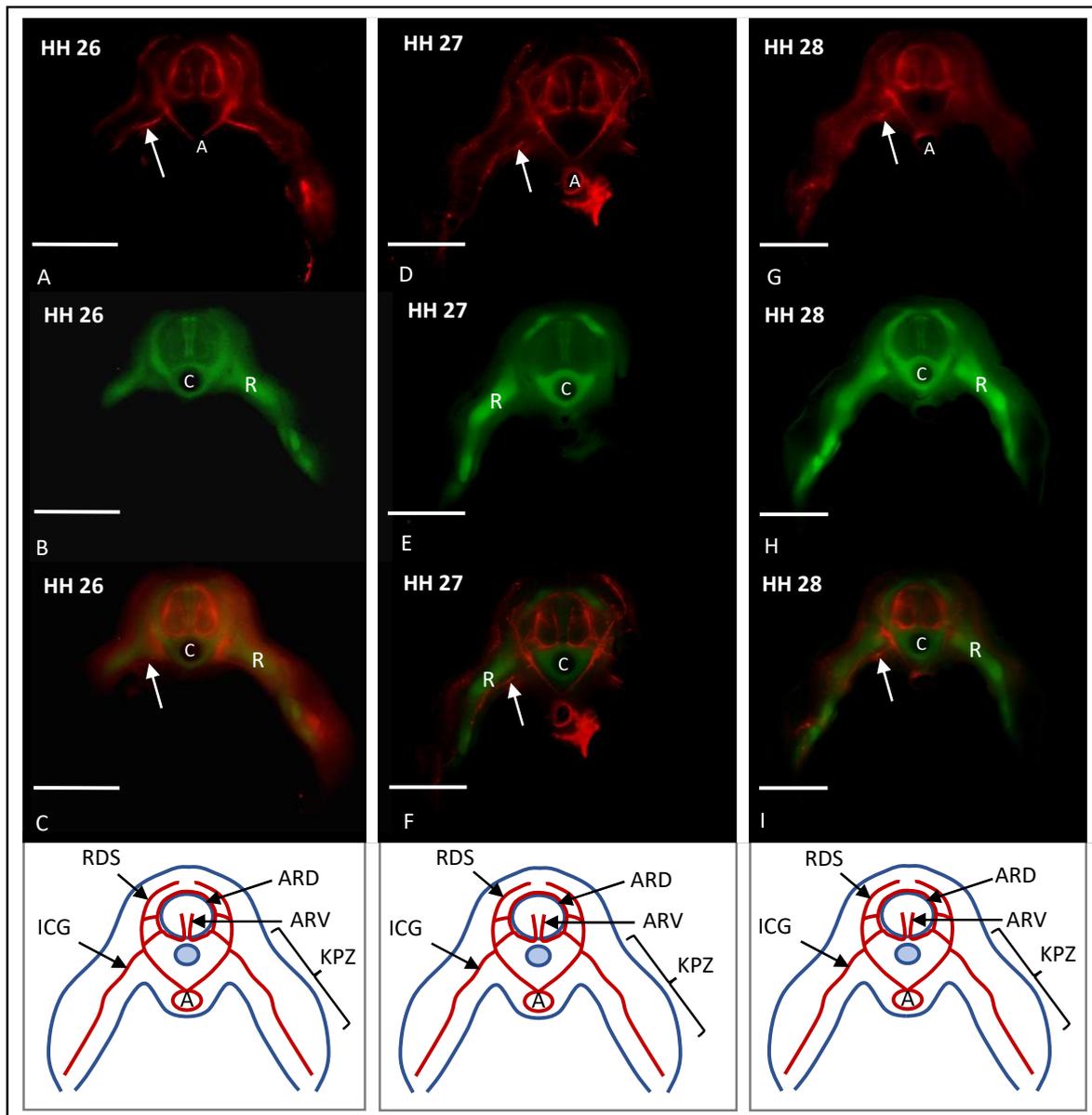


Abbildung 22 Ergebnisse der mit Dil-markierten Gefäße, sowie IHC der Knorpelprogenitorzellen bei Transversalschnitten der Stadien HH 26 – HH 28; A, D, G: Stadien HH 26 – 28 nach Dil-Injektion; B, E, H: Stadien HH 26 – 28 nach IHC gegen Sox9, die markierten Zellen haben sich ausgebreitet und definierte Formen angenommen; C, F, I: Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse der jeweiligen Stadien, die ISG (= durchgehende Pfeile) verlaufen ventral bzw. medial der embryonalen Rippen (= R); Zeichnungen zeigen Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse der jeweiligen Stadien (A = Aorta, durchgehende Pfeile zeigen Interlostalgefäße, C = Chorda, gestrichelte Pfeile zeigen rippenähnlichen Verlauf der Knorpelprogenitorzellen, KPZ = Knorpelprogenitorzellen, ICG = Interkostalgefäß, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, RDS = Ramus dorsalis) scale bars 1mm

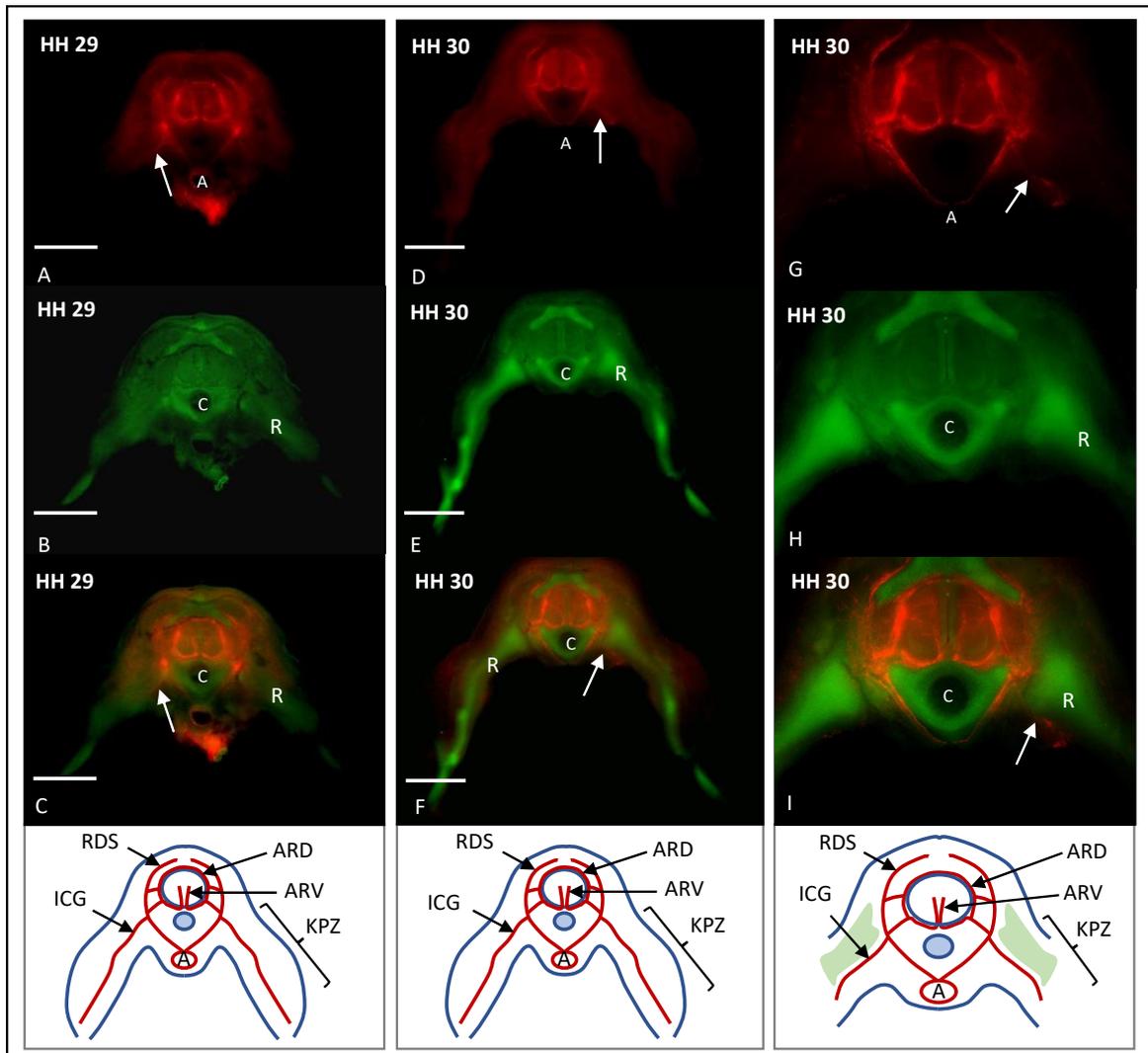


Abbildung 23 Dil-Injektion der Gefäße und IHC der Knorpelprogenitorzellen bei Transversalschnitten der Stadien HH 29 – HH 30, A, D: Stadien HH 29 – 30 nach Dil-Injektion; B, E: Stadien HH 29 – 30 nach IHC gegen Sox9; C, F: Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse der Stadien HH 29 – 30; G, H, I: Nahaufnahmen der Dil- und IHC-Ergebnisse von Stadium HH 30 (D, E, F); Zeichnungen zeigen Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse der jeweiligen Stadien (A = Aorta, C = Chorda, Pfeile = Interkostalgefäße, R = Verlauf der Knorpelprogenitorzellen, KPZ = Knorpelprogenitorzellen, ICG = Interkostalgefäß, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, RDS = Ramus dorsalis) scale bars 1mm

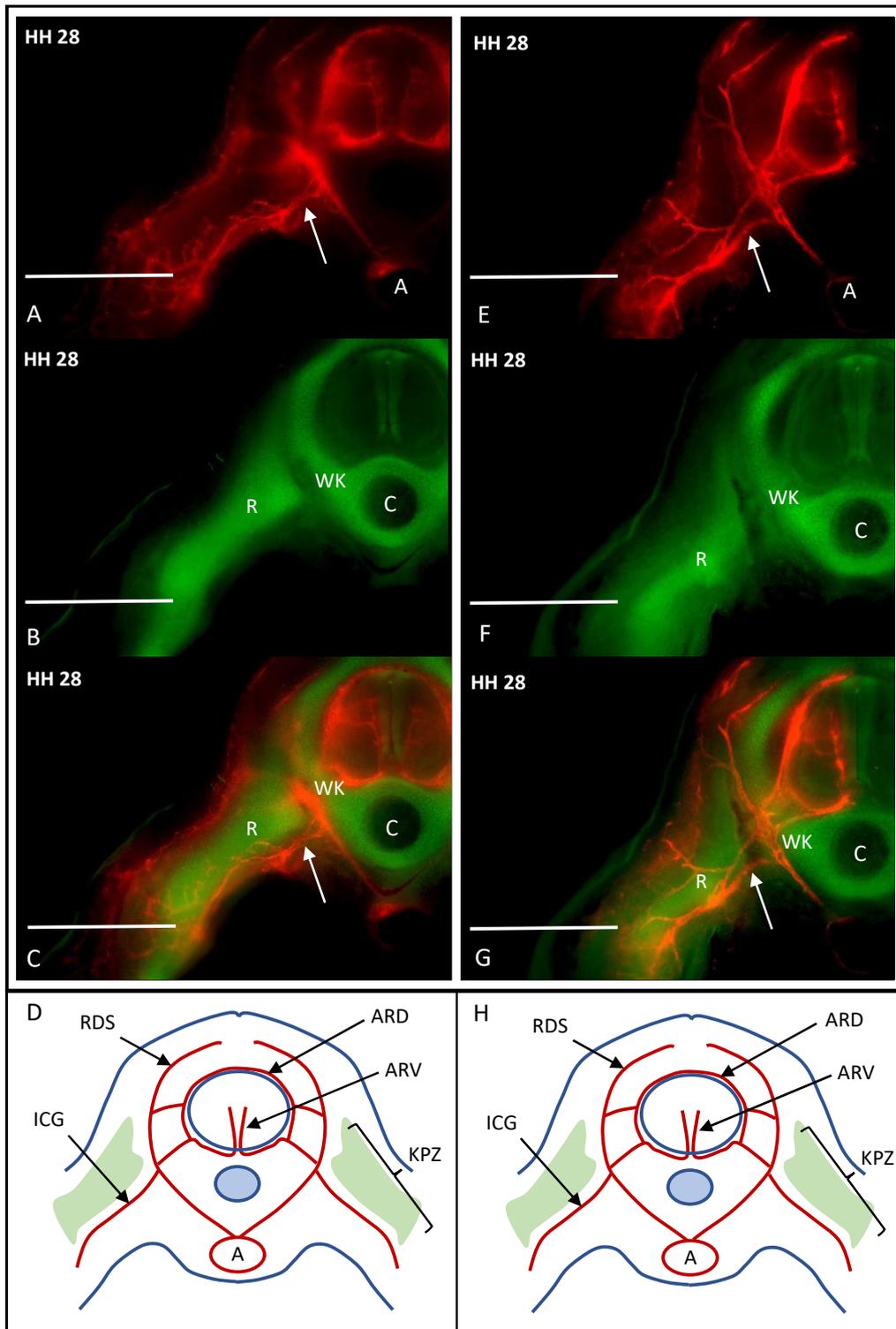


Abbildung 24 Nahaufnahmen von Transversalschnitten der Stadien HH 28 nach Dil-Injektion und IHC gegen Sox9; A, E: Stadium HH 28 mit Dil-markierten Gefäßen; B, F: Stadium HH 28 nach IHC gegen Sox9; C, G: Überlagerung der Dil- und IHC-Ergebnisse von Stadium HH 28; D, H: schematische Darstellung der Dil- und IHC-Ergebnisse von Stadium HH 28 (A = Aorta, C = Chorda, R/KPZ = Knorpelprogenitorzellen, WK = Wirbelkörper, ICG/Pfeile = Interkostalgefäße, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, RDS = Ramus dorsalis) scale bars 1mm

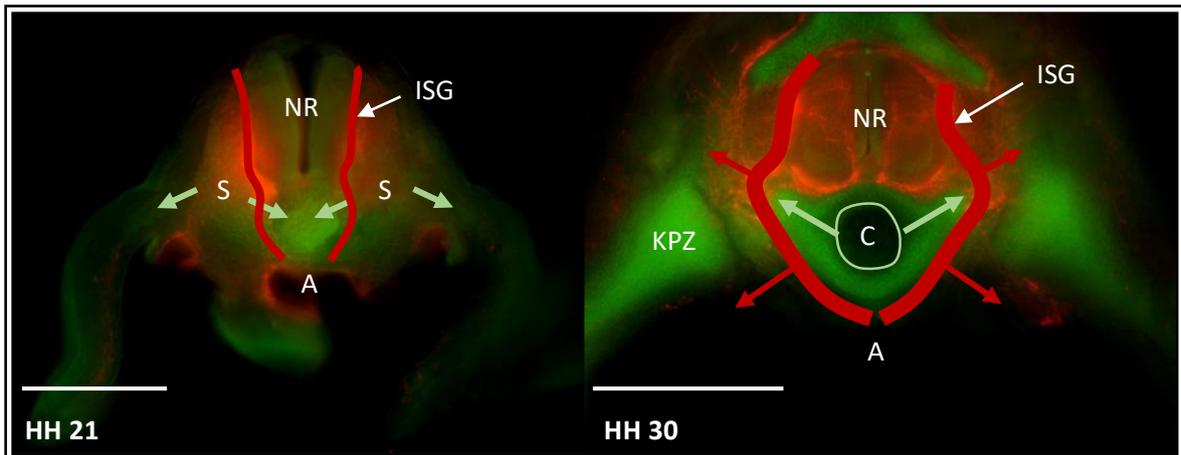


Abbildung 25 Schematische Ergänzung zum Verlauf der ISG in Zusammenhang mit der Entwicklung chondrogener Strukturen bei den Stadien HH 21 und HH 30; HH 21 zeigt die Somiten (= S), die den Bereich zwischen den ISG einnehmen, in diesem Stadium breitet sich das Sklerotom bereits nach lateral und medial aus (grüne Pfeile); HH 30 zeigt den Verlauf der ISG, der durch die Differenzierung der Knorpelprogenitorzellen beeinflusst wird (= KPZ), die chondrogenen Strukturen nehmen an Form an und breiten sich aus (grüne Pfeile), während die ISG dadurch bedingt nach lateral verschoben werden (rote Pfeile) (A = Aorta, NR = Neuralrohr, C = Chorda, ISG = Intersegmentalgefäß, S = Somiten, KPZ = Knorpelprogenitorzellen) scale bars 1mm

4.4 Versuchsergebnisse der Vibratom-Schnitte bei den Stadien HH 29 - 31

Die Erstellung von Vibratomschnitten von relevanten Stadien wurde mit dem Ziel vorgenommen, den Gefäßverlauf der ISG, sowie die Abgabe neuer Äste mit noch höherer Vergrößerung im Detail genau zu verfolgen (N = 3).

Die Bearbeitung der Transversalschnitte setzte zunächst voraus, dass das Dil-Signal der jeweiligen Schnitte ausreichend stark war. Darüber hinaus war es wichtig, dass die Gefäßverläufe lichtmikroskopisch durchgehend nachverfolgt werden konnten. Da sich der Durchmesser der Schnitte auf 80-100 µm beschränkt, besteht die Möglichkeit, dass die Gefäße durch die dünnen Schnitte nicht durchgängig erfasst werden können. Dies liegt daran, dass die Gefäße in ihrem anatomischen Verlauf nicht zwangsläufig in einer Ebene liegen. Aus diesem Grund wurden nicht nur Einzelschnitte, sondern Schnittserien beurteilt, um den gesamten Verlauf auch über die Grenzen der Schnitte hinweg nachzuvollziehen.

Die Übersicht der einzelnen Schnitte zeigt die drei Gefäßabgänge, die schon in den vorausgegangenen Ergebnis-Teilen beschrieben wurden. Die *Arteriae radicales* versorgen das Neuralrohr und der *Ramus cutaneus* verläuft beidseits dorso-medial des Wirbelkörpers (Abb. 26 A, D, G).

Bei den Nahaufnahmen der einzelnen Schnitte wird der Fokus auf den Verlauf der Interkostalgefäße gelegt (Abb. 26 B, E, H). Die Beurteilung erfordert den Vergleich der aufeinanderfolgenden Schnitte. Trotzdem kann der Abgang der Interkostalgefäße in den Vibratom-Schnitten nicht eindeutig nachverfolgt werden. Nach Abgang auf Höhe der Chorda wird der weitere Verlauf in dem vorhandenen Schnittmaterial nicht vollständig erfasst.

Durch die Darstellung der Strukturen im Durchlicht mit Phasenkontrast werden die chondrogenen Progenitorzellen rein histomorphologisch ohne knorpelspezifische Färbung farblich vom restlichen umliegenden Gewebe unterschieden (Abb. 26 C, F, I). Auf diese Weise lässt sich der Gefäßabgang in Zusammenhang mit den umliegenden skelettalen Strukturen beurteilen. Man kann erkennen, dass der Gefäßast medial des chondrogenen Gewebes (hier als KPZ markiert) verläuft. Dies legt nahe, dass es sich bei den Abgängen um die Interkostalgefäße handelt. Die Vibratom-Schnitte bestätigen demnach die Ergebnisse, die in den Kapiteln 4.3.1 sowie 4.3.2 beschrieben wurden. Dabei sind auch Details der Gefäßmorphologie besser erkennbar, allerdings lassen sich die Gefäßverläufe aufgrund der dünnen Schnittebenen nicht komplett zeigen.

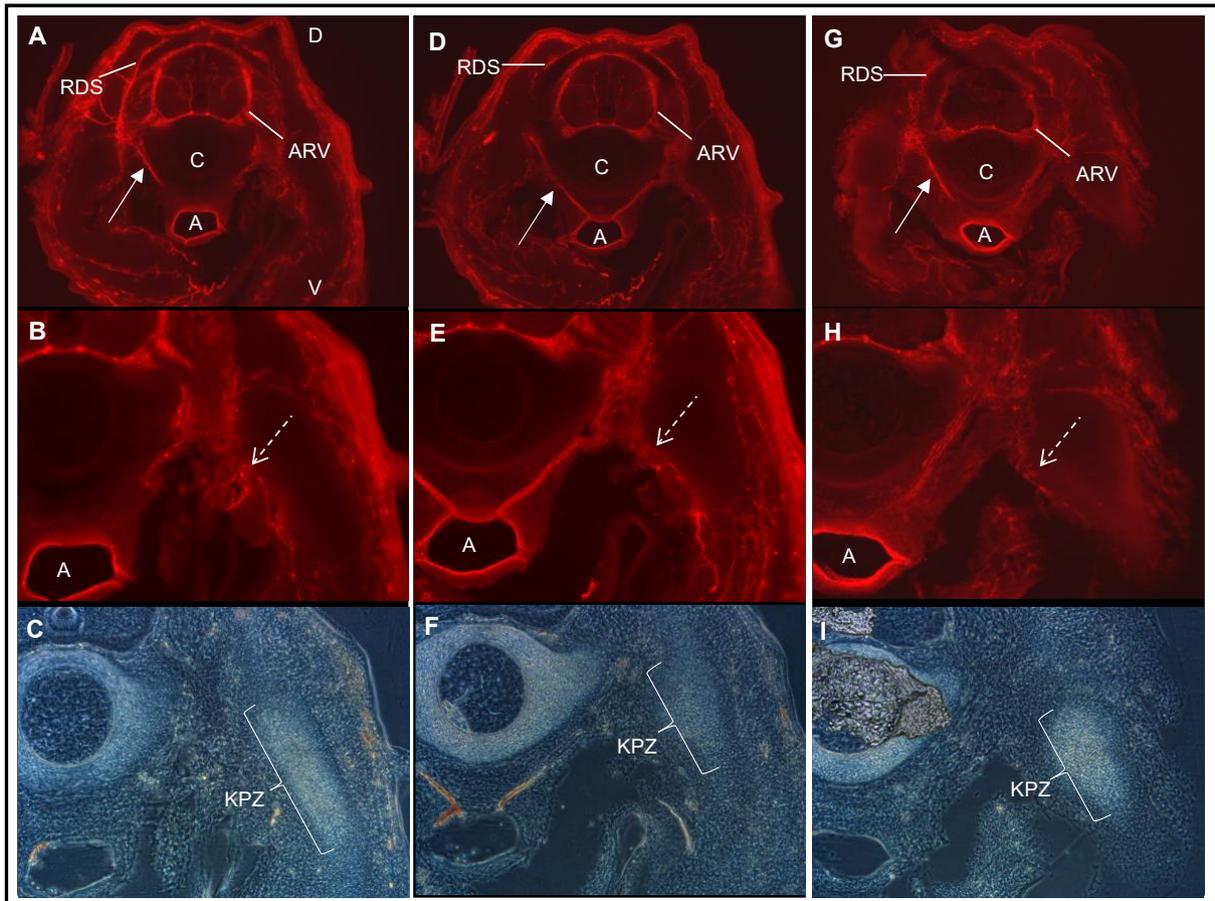


Abbildung 26 Vibratom-Schnitte von Stadium HH 30 in Transversalebene nach Dil-Injektion, sowie im Durchlicht mit Phasenkontrast zur Darstellung der unterschiedlichen Gewebestrukturen, Vergrößerung 20fach; A, D, G Aufnahme der Vibratom-Schnitte unter Cy3-Filter, man erkennt Gefäße, die durch Dil-Injektion markiert wurden (D = dorsal, V = ventral, A = Aorta, C = Chorda, durchgehende Pfeile zeigen ISG, ARV = Arteria radicularis ventralis, RDS = Ramus dorsalis); B, E, H Detailaufnahmen der Vibratom-Schnitte (A = Aorta, gestrichelte Pfeile zeigen Gefäßäste); C, F, I Detailaufnahmen im Durchlicht mit Phasenkontrast (KPZ = Knorpelprogenitorzellen)

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung der ISG durch Dil-Markierung der Gefäße im Zusammenhang mit der Wirbelentwicklung untersucht. Dabei konnte die Dynamik der Verlagerung der ISG im Kontext der Wirbelbildung und die Entstehung wichtiger Äste der ISG im Bereich der Wirbelsäule und des Rückenmarks gezeigt werden. Die Ergebnisse unterstützen die Arbeitshypothese, dass die ISG während der Resegmentierung und des folgenden Wachstums der Wirbelkörper nach lateral verdrängt werden und so auf der lateralen Oberfläche der Wirbelkörper zu liegen kommen. Die Ergebnisse widerlegen die Alternativhypothese, dass die ISG im intersegmentalen Spalt obliterieren und durch neu aussprossende definitive Interkostalgefäße ersetzt werden. Das Aussprossen der Interkostalgefäße im engeren Sinne, also der die Rippen begleitenden Gefäße, konnte auf das Stadium HH 24 festgelegt werden, und zwar durch angiogenetisches Aussprossen der ICG aus den nach lateral verlagerten ISG.

5 Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit der Differenzierung der intersegmentalen Gefäße im Hühnerembryo im Zusammenhang mit der skelettalen Entwicklung, insbesondere der Wirbelsäule und der Rippen. Dafür wurden die embryonalen Blutgefäße durch Injektion des Vitalfarbstoffs Dil fluoreszent markiert und ihre Entwicklung über mehrere Entwicklungsstadien dokumentiert. Durch immunhistochemische Darstellung der Wirbelsäule mit einem Antikörper gegen den Knorpelmarker Sox9 wurde gleichzeitig die Entwicklung des Achsenskeletts dokumentiert, sodass die Gefäßentwicklung und die Skelettentwicklung im selben Embryo korreliert werden konnten.

Die Entstehung sowie das Wachstum der Intersegmentalgefäße (nachfolgend ISG genannt) stellt in der frühen Embryonalphase eines der ersten bekannten Beispiele für den Prozess der Gefäß-Entwicklung durch Angiogenese dar. Insbesondere anhand des Zebrafish-Modells konnte in früheren Arbeiten die Entstehung dieser Gefäße einschließlich der molekularen Regulation beschrieben werden. Sie bilden die ersten Gefäßfortsätze aus der dorsalen Aorta und verlaufen durch den Bereich zwischen den Somiten, welche die frühe Körperachse bilden, nach dorsal. Sobald sie das Neuralrohr erreicht haben, bilden sie Anastomosen mit den nach anterior und posterior benachbarten ISG, wodurch das dorsale longitudinale anastomotische Gefäß entsteht (engl *dorsal longitudinal anastomotic vessel*). Die ISG bilden zudem Anastomosen mit der Kardinalvene, wodurch die Segmentvenen zustande kommen [120].

Hinsichtlich der weiteren Entwicklung der ISG wurde insbesondere die Differenzierung der neuralen Gefäße im Bereich des Rückenmarks intensiv beschrieben. Sabin hat 1917 in ihrer Arbeit zum Ursprung und Entwicklung der primitiven Gefäße beim Huhn und Schwein beschrieben, dass die Intersegmentalgefäße neue Arterien nach spinal abgeben. Diese unterteilen sich in zentrale und laterale Äste [151]. Dies bestätigte frühere Beobachtungen durch Evans 1909. Evans hat außerdem geschildert, dass die ventralen spinalen Äste im weiteren Verlauf zur unpaaren anterioren Spinalarterie fusionieren [148]. Diese Beobachtungen wurden zudem 1960 durch Romanoff zusammengefasst und 1988 durch Coffin und Poole mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen erneut beschrieben [150, 152].

Das weitere Schicksal der Intersegmentalgefäße blieb allerdings unklar.

Da unterschiedliche Wirbeltiere in ihrer frühen Entwicklung einen sehr ähnlichen Bauplan aufweisen, auch hinsichtlich des Blutgefäßsystems, können die Ergebnisse eines Modells zumindest teilweise auch auf andere Tiermodelle übertragen werden [140]. Daher werden im Folgenden auch Bezüge zu Arbeiten genommen, in denen Versuche an anderen Tier-Modellen als dem Huhn durchgeführt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Intersegmentalgefäße von Hühnerembryonen unter Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffes Dil markiert. Auf diese Weise konnten die Gefäße in aufeinanderfolgenden Stadien sichtbar gemacht und der Entwicklungsverlauf nachverfolgt werden. Zur Darstellung der Lage der Gefäße relativ zu den skelettalen Strukturen wurden außerdem die Knorpel-Progenitorzellen der verschiedenen Stadien mithilfe eines Antikörpers gegen den frühen Knorpelmarker Sox9 markiert. Dadurch war es möglich, den Einfluss der benachbarten skelettalen Strukturen auf diese Gefäße zu untersuchen.

5.1 Entwicklung der Intersegmentalgefäße in den Stadien HH 16 – HH 30

Die paarigen Intersegmentalgefäße entspringen der Aorta und verlaufen in den Stadien HH 16 – HH 22 mehr oder weniger senkrecht, zwischen den Somiten und lateral von Chorda und Neuralrohr, nach dorsal. Dort liegen sie dem Neuralrohr seitlich an und bilden Anastomosen zu den nach kranial und kaudal angrenzenden arteriellen ISG. Diese Beobachtungen sind bereits bekannt und wurden unter anderem durch Ellertsdottir et al. in einer Arbeit zur Gefäßmorphologie im Zebrafisch-Embryo beschrieben, sowie in anderen Arbeiten über das Zebrafisch-Modell [106, 153]. Es bestehen außerdem Anastomosen zu Ästen der posterioren Kardinalvene, die ebenfalls nach dorsal verlaufen.

In den Transversalschnitten der Stadien HH 23 – HH 25 geben die ISG neue Äste an das Neuralrohr und das umliegende Gewebe ab. Der Verlauf der Äste und deren Verzweigung wurde bereits detailliert unter anderem durch Sabin aufgezeigt [151].

In dieser Arbeit zeigte sich allerdings erstmals, dass die ISG insbesondere im thorakalen Bereich der Stadien HH 24 – HH 30 temporär eine gemeinsame Gefäßwurzel aufweisen und sich erst sekundär aufteilen. Dieses Detail wurde allerdings variabel beobachtet und war weder in den thorakalen noch in den lumbalen Schnitten durchgehend vorzufinden. In früheren Arbeiten wurde dieses Detail bisher nicht dokumentiert oder bildlich dargestellt. Als Grund für die unpaare Gefäßwurzel lassen sich verschiedene Faktoren diskutieren. Zum einen könnte die Entwicklung der embryonalen Rippen im thorakalen Bereich die Gefäße nach medial drängen, sodass diese zu einem Stamm fusionieren. Allerdings könnte das Zusammentreten der Abgänge auch nur ein relatives sein. Wenn der ganze Embryo und damit die Aorta im Rahmen der Entwicklung an Größe zunehmen, die Abgänge der ISG jedoch an der gleichen Stelle bleiben, kommt es somit zu einer scheinbaren Vereinigung beider Wurzeln. Auf diese Weise ließe sich zumindest auch die Unregelmäßigkeit der Beobachtungen, insbesondere im direkten Vergleich zwischen thorakalen und lumbalen Schnitten, erklären.

Im Verlauf dieser Stadien wirkt sich außerdem das Wachstum der benachbarten Strukturen auf den Verlauf der ISG aus. Ab Stadium HH 24 werden die ISG insbesondere durch die skelettalen Strukturen – vor allem Wirbelkörper und Wirbelbogen – beeinflusst. Die genaue

Entwicklung dieser Strukturen wurde schon vielfach beforscht und beschrieben. Dabei tragen die sklerotomalen Zellen eines Somiten zur Entwicklung zwei aufeinanderfolgender Wirbelkörper und Rippen bei [76, 77]. Diese Resegmentierung der Somiten verursacht die Lateralisierung der ISG, die in dieser Arbeit im Embryo gezeigt wird und im adulten Organismus persistiert (siehe grafische Darstellung Abb. 27).

Der Prozess der Resegmentierung bewirkt also, dass der intersegmentale Bereich, in dem die ISG verlaufen, durch das Wachstum des Wirbelkörpers eingenommen wird. Anhand unserer Versuchsergebnisse können wir die Hypothese bestätigen, dass die ISG während der Resegmentierung weiterhin bestehen bleiben, aber durch diese Entwicklung nach lateral verdrängt werden.

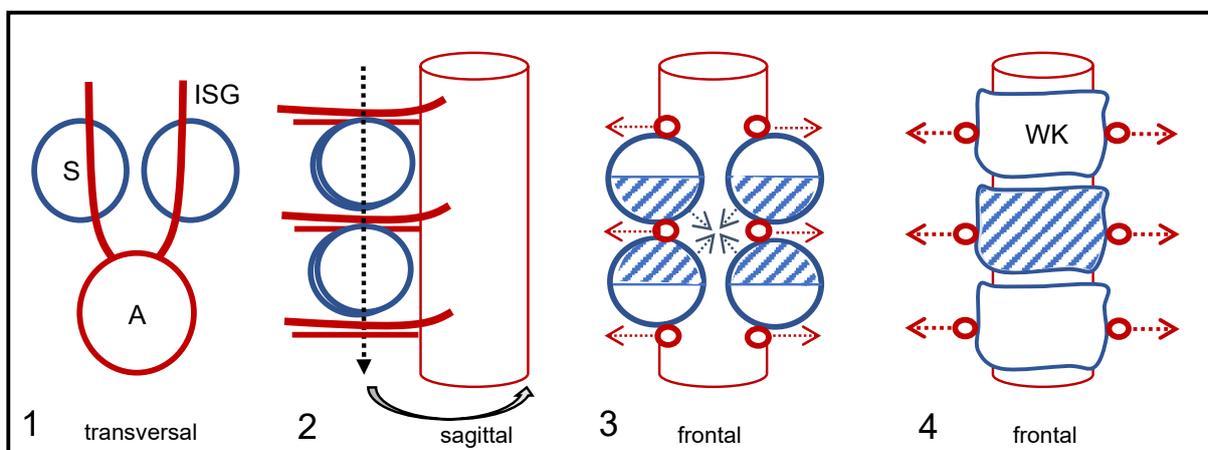


Abbildung 27 Grafische Darstellung der Resegmentierung in verschiedenen Ebenen: 1 Blick auf Aorta, Somiten und ISG von transversal, Ebene der ISG und Somiten liegen übereinander; 2 Blick von sagittal, ISG verlaufen zwischen Somiten, gestrichelte Pfeile zeigen Schnittebene für Frontalansicht (3, 4); 3 Ansicht von frontal, ISG verlaufen zwischen Somiten, blau schraffierte Ebene der Somiten zeigen zukünftige Wirbelkörper-Bestandteile, gestrichelte Pfeile in blau und rot zeigen Differenzierungsrichtung von Somiten (blau) und ISG (rot); 4 Ansicht von frontal nach weiterer Differenzierung, schraffierte Fläche zeigt Wirbelkörper, ISG wurde lateral des Wirbelkörper verdrängt (A = Aorta, S = Somiten, G = Intersegmentalgefäß, W = Wirbelkörper)

Bereits 1960 wurden durch Romanoff die Befunde früherer Arbeiten zusammengefasst, dass die ISG verschiedene neue Äste abgeben. Demnach gibt es sowohl dorsale als auch ventrale Äste, die von lateral kommend zum Neuralrohr hinziehen. Das Wachstum, sowie die Größenzunahme der Gefäße wurde dabei bei den Stadien HH 25 – 26 beschrieben [150]. Ähnliche Beobachtungen konnten in dieser Arbeit aber schon beginnend in den Stadien HH

23 und HH 24 gemacht werden. Ab Stadium HH 24 entwickeln sich außerdem Gefäßäste, die aufgrund ihrer Wachstumsrichtung nach ventral als Anlagen der Interkostalgefäße bezeichnet werden können. Diese Äste werden in den Stadien HH 26 – HH 30 weiterhin beobachtet und ziehen weiter nach ventral.

Die Stadien HH 26 – HH 30 weisen die gleichen morphologischen Strukturen auf, doch im Gegensatz zu den vorherigen Stadien werden die Gefäßabgänge der ISG differenzierter und verzweigter. Die Gefäße, die das Neuralrohr versorgen, geben ebenfalls weitere Äste ab, sodass das gesamte Neuralrohr mit Blutgefäßen versorgt wird.

Die Bezeichnungen der neuen Gefäße in dieser Arbeit orientiert sich an der Terminologie früherer Publikationen [151]. Die *Arteria radicularis ventralis* und *dorsalis* werden nachfolgend als *Arteriae radicales* zusammengefasst. Darüber hinaus ziehen Gefäße dorsal des Neuralrohrs – *Rami dorsales* –, die ebenfalls bereits früher beschrieben worden sind [150]. Bei diesen Ästen dürfte es sich nach der topografischen Lage um Strukturen zur Versorgung der Haut oder Muskulatur des Rückens handeln.

5.2 Entwicklung embryonaler Knorpel-Vorstufen der Stadien HH 20, HH 26 – HH 30

Die Entwicklung des Skelettsystems spielte bei der Fragestellung dieser Arbeit eine besondere Rolle, da das Wachstum des Skeletts die Differenzierung der Intersegmentalgefäße beeinflusst. Hier ist vor allem die Entstehung von Wirbelkörper und Rippen von Interesse. Zum einen, weil die Wirbelkörper im Zuge der Resegmentierung den intersegmentalen Bereich ausfüllen [76], zum anderen, um die Differenzierung der Gefäßäste den Rippenanlagen zuordnen zu können. Ausgereifte Chondrozyten sind erst im 17-Tage-alten Hühnerembryo nachweislich ausgebildet [154]. Daher wurde für die Darstellung der Skelettentwicklung in dieser Arbeit ein

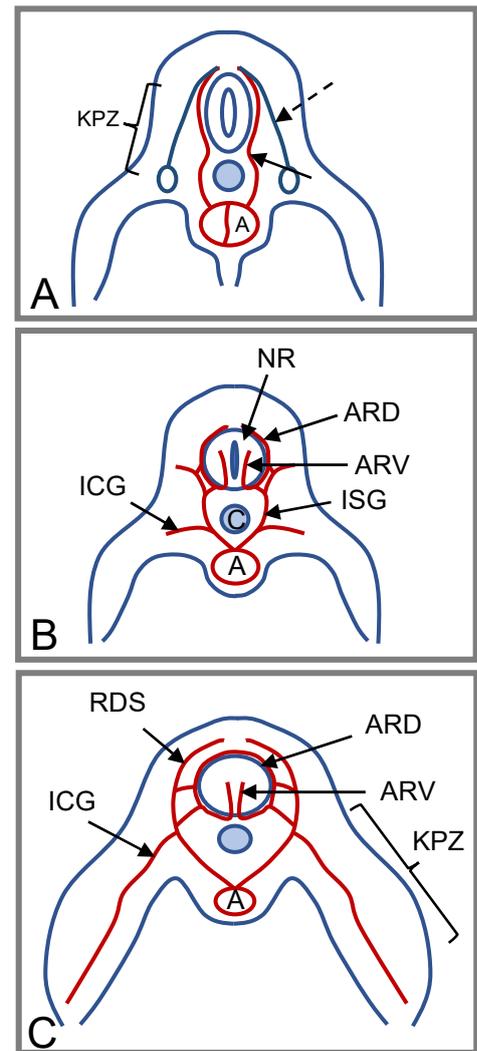


Abbildung 28 Grafische Darstellung der Transversalschnitte der wichtigsten Entwicklungsschritte HH 21, HH 24 und HH 28 mit Dil- sowie Sox9-Markierung: A Stadium HH 21, Knorpelprogenitorzellen (KPZ) verdichten sich v.a. um Chorda und Neuralrohr, ISG verlaufen senkrecht nach dorsal (durchgehender Pfeil); B Stadium HH 24, die ISG teilen sich sofort nach dem Abgang in paarige Gefäße auf, Gefäßäste gehen bereits ab; C Stadium HH 28, die Knorpelprogenitorzellen haben deutlich die Form von Wirbelkörper und Rippen angenommen, Interkostalgefäße laufen medial der Rippen nach ventral (A = Aorta, NR = Neuralrohr, ISG = Intersegmentalgefäß, ARV = Arteria radicularis ventralis, ARD = Arteria radicularis dorsalis, ICG = Interkostalgefäß)

Knorpelmarker verwendet, der schon früher, während der Entstehung der Knorpel-Vorstufen, aktiv ist.

Wir verwendeten den Transkriptionsfaktor Sox9, der für die Kondensation von mesenchymalen Knorpelzell-Vorstufen und die Entwicklung von proliferierenden Chondrozyten essentiell ist [155]. Dadurch war es möglich, den Verlauf der ISG und deren Äste in direkten Zusammenhang mit den umgebenden Knorpel-Strukturen zu setzen und dies schon bei sehr jungen Stadien.

In den Stadien HH 20 und HH 21 sind die Sox9-positiven Knorpelvorläuferzellen auf die Sklerotome der Somiten beschränkt. Die ISG verlaufen senkrecht nach dorsal und werden in ihrem Verlauf noch nicht durch andere Strukturen beeinflusst. Aufgrund der Transversalschnitte, die in der Arbeit angefertigt wurden, entsteht zwar der Eindruck, als würden sich die Gefäße und der Bereich, in dem die Knorpelvorläuferzellen differenzieren, in der gleichen Ebene befinden. Betrachtet man jedoch die dreidimensionale Differenzierung des Sklerotoms, wird deutlich, dass sich die Differenzierung des Knorpels zunächst auf den Bereich der Somiten beschränkt [61]. Da die ISG zwischen den Somiten verlaufen, überlappen Sklerotome und ISG in diesen Stadien nicht. Dies wäre in Längsschnitten auch experimentell zu zeigen, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht angefertigt werden konnten (siehe Abbildung 28).

Die immunhistochemische Untersuchung der Stadien HH 24 und HH 25 mit Sox9 lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. Dadurch kann ein relevanter Abschnitt der Gefäßentwicklung leider nicht in direkten Zusammenhang mit der Knorpel-Entstehung gesetzt werden. Die Ursache für die technischen Probleme bei diesen Stadien ist unklar. Da die Versuche bei jüngeren Stadien Sox9 Expression im Sklerotom gezeigt haben, wäre auch in den Stadien HH24 und HH25 Sox9-Expression zu erwarten. Die wichtige Rolle, die Sox9 während der gesamten Differenzierung von Chondrozyten spielt, wurde vielfach beschrieben [155, 156]. Für die Auswertung dieser Arbeit reichen in diesen Stadien jedoch die vorliegenden Gefäßverläufe durch Dil-Markierung aus, da man in den jüngeren und älteren Stadien die Entwicklung von Wirbelkörper und Rippen ausreichend nachvollziehen kann.

Die Stadien HH 26 – HH 30 weisen wiederum eine fortgeschrittene Knorpelentwicklung auf. Die Färbungen mit einem Sox9-Antikörper zeigen deutlich die Wirbelkörper- und Rippen-Anlagen, die inzwischen, im Rahmen der Resegmentierung, den intersegmentalen Bereich eingenommen haben [77]. Die Gefäße verlaufen in diesem Stadium außen um die Wirbelanlage. Dieser Verlauf deutet darauf hin, dass die Gefäße durch den Prozess der Resegmentierung von den Wirbelanlagen zur Seite gedrängt wurden. Um diese Annahme zu untermauern, könnte man zusätzlich Sagittalschnitte anfertigen, die diesen Prozess klar zeigen könnten. Wichtig ist festzuhalten, dass die ISG nie obliterieren und durch andere Gefäße ersetzt werden, sondern immer funktionell bleiben und lediglich die Lage verändern.

Es liegt also Gefäß-Remodeling vor. Der Prozess dieses Remodelings wurde schon in verschiedenen Arbeiten beschrieben, die sich mit dem Thema Gefäßentwicklung auseinandergesetzt haben. Ouarné et al. haben 2021 die wichtigsten Fakten auf diesem Gebiet zusammengefasst. Demnach findet eine Remodellierung von Arterien und Venen statt, um den Innendurchmesser der Gefäße in Orientierung an das lokale Gewebe anzupassen und somit eine optimale Perfusion dessen zu gewährleisten [157]. Diese Fähigkeit zur Adaption spiegelt sich in der Entwicklung der ISG wider, deren Lage sich aufgrund des Wachstums umliegender Strukturen verändert.

Die ISG liegen der Wirbelanlage schließlich lateral an und geben sowohl Äste zur Versorgung des embryonalen Knorpels und des Neuralrohrs ab, sowie für Strukturen, die dorsal des Knorpels liegen. [151].

Die embryonalen Rippen reichen an diesem Punkt bereits weit nach ventral. Dabei verlaufen die Interkostalgefäße ventral der Rippenanlagen und geben kleinere Äste ab, die die Rippen mit Blut versorgen. Die Schnittbilder zeigen aus dieser Perspektive allerdings nicht, ob die Gefäße am kranialen oder kaudalen Rand der Rippe verlaufen. Im adulten Huhn verlaufen die Interkostalgefäße nach Schummer zweigespalten entlang des kranialen und kaudalen Randes einer Rippe [158]. Ob dies auch schon in diesem frühen Embryonalstadium so ist, müsste anhand von Sagittalschnitten geklärt werden. Um dies beurteilen zu können, müsste man wiederum zusätzlich sagittale Schnitte anfertigen.

Der Befund aus dieser Arbeit, dass die ISG im intersomitischen Spalt nicht obliterieren, sondern persistieren und nach lateral verlagert werden, ist auch interessant hinsichtlich der Wirbelmorphologie in anderen Spezies. Sowohl in ausgestorbenen Plesiosauriern [142] als auch in Schwanzwirbeln von manchen Walen [159] gibt es dorsoventral verlaufende Foramina in den Wirbelkörpern, die als Kanäle für im ehemaligen intersomitischen Spalt verbliebene Arterien gedeutet werden können. Diese wären demnach, während der Resegmentierung ortsständig geblieben und von den Wirbelkörpern umwachsen worden, und hätten damit die frühembryonale Situation konserviert. Ob diese Hypothese stimmt, muss zwar offenbleiben, aber im Huhn und vermutlich auch bei Säugern, die diese intravertebralen Foramina nicht aufweisen, konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass die ISG durch Remodeling auf eine Position lateral der Wirbel verlagert werden.

Unsere Markierungen der Knorpel-Vorstufen, sowie der Blutgefäße haben bestätigt, dass die ISG zumindest beim Huhn sowohl die Grundlage für die sich später entwickelnden Interkostalgefäße darstellen, als auch für Gefäße, die das Neuralrohr und das dorsal gelegene Gewebe versorgen.

In dieser Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die Interkostalgefäße durch Angiogenese aus den schon vorhandenen ISG nach lateral aussprossen. Ob zuerst die Gefäße nach ventral

wachsen oder die rippenbildenden Knorpelzellen, kann aufgrund der Daten dieser Arbeit nicht eindeutig festgelegt werden. Es ist allerdings zu vermuten, dass die Gefäße dem Knorpel zuvorkommen und in den sauerstoffarmen Bereich der Somatopleura vorwachsen, um nachfolgend das Rippenwachstum zu ermöglichen. Dieses Phänomen wurde durch Versuche an Hühnerembryonen beschrieben, bei denen die VEGF-Expression und damit die Bildung neuer Gefäße unter hypoxischen Bedingungen bestimmt wurde [160]. Tongers et al. greifen diesen Aspekt in ihrer Arbeit über die Rolle endothelialer Progenitorzellen bei Ischämie-induzierter Vaskulogenese und Kollateraler Bildung erneut auf. Demnach werden endotheliale Progenitorzellen (EPC) im Rahmen ischämischer Zustände mobilisiert und beeinflussen das Wachstum neuer Gefäße beispielsweise durch Sezernierung verschiedener Proteine, wie Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen [161]. Zudem spielt ein weiterer Transkriptionsfaktor bei hypoxischen Zuständen eine wichtige Rolle. Schipani et al. haben 2001 untersucht, wie unter anderem das Knorpelwachstum durch diesen Faktor beeinflusst wird. Der sogenannte hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) schreitet im Rahmen eines hypoxischen Ereignisses ein und kontrolliert die Expression sowohl von Erythropoetin als auch von verschiedenen Glukose-Transportern, sowie VEGF [162-165]. Ein Fehlen der Subdomäne HIF-1 α führte demnach zu Miss- und Fehlbildungen in knorpeligen Strukturen der neugeborenen Mäuse [164]. Es ist also ersichtlich, dass das Knorpelwachstum im gesunden Organismus der Anwesenheit von Sauerstoff und dadurch der arteriellen Blutversorgung bedarf.

Um die zeitliche Dynamik der Differenzierung von Knorpelgewebe und Blutgefäßen in diesem Zusammenhang zu untersuchen, könnte man in zukünftigen Arbeiten die zeitliche Expression von VEGF bzw Sox9 im thorakalen Bereich experimentell untersuchen.

5.3 Ausblick

In Bezug auf die Intersegmentalgefäße gibt es nach wie vor eine große Anzahl an Möglichkeiten für zukünftige Forschung.

Die vorliegende Arbeit hat erstmals einen Überblick über die morphologischen Vorgänge bei der Differenzierung der Intersegmentalgefäße im Zusammenhang mit der Entwicklung der Wirbelsäule im Hühnerembryo gegeben. Während sich diverse Forschungsgruppen im Zebrafisch-Modell mit den molekularen Faktoren, z.B. Hedgehog-Signalmolekülen, der Neubildung der ISG auseinandergesetzt haben [89, 122], ist über die Faktoren, die während der weiteren Differenzierung dieser Gefäße eine Rolle spielen, bisher wenig bekannt [122].

Daher wäre es interessant herauszufinden, welche molekularen Regulationsvorgänge, während der Resegmentierung aktiv sind, bzw. welche Auswirkung eine Inaktivierung der verschiedenen, aus dem Zebrafisch bekannten Gene auf die Resegmentierung im

Hühnerembryo hätte. Diese Ergebnisse könnten auch Rückschlüsse auf die entsprechenden Vorgänge in der Embryonalentwicklung des Menschen zulassen.

Entsprechend dient der Hühnerembryo als wichtiges Modell für die Beforschung der dorsalen Aorta. Garriock und Mikawa haben die Faktoren, die das Wachstum der Aorta sowohl positiv als auch negativ beeinflussen, ausführlich zusammengefasst [110]. Die BMP-Inhibitoren Noggin und Chordin sind demnach essentiell, zum einen für die korrekte Anordnung neuer Gefäße, zum anderen für die Organisation bei Wachstum und Gefäßreparatur [110].

Eine Option für zukünftige Forschungsansätze wäre es daher, diese Wachstumsfaktoren während der Differenzierung der ISG zu untersuchen. Spielen Noggin und Chordin an diesem Punkt der Entwicklung ebenfalls eine Rolle, oder sind sie auf die dorsale Aorta beschränkt?

Es ist zudem bekannt, dass Dorsomorphin im Zebrafischembryo die Bildung der ISG verhindert, möglicherweise indem es VEGFR2 hemmt [166]. Allerdings sind bisher keine Faktoren beschrieben worden, die das Wachstum neuer Gefäßäste aus den ISG beeinflussen. Fraglich ist also, ob das angiogenetische Aussprossen aus den ISG durch die Regulationsmechanismen kontrolliert wird, die schon während der Entstehung der ISG eine Rolle spielen, oder ob es dabei zur Aktivierung neuer, bisher unbeschriebener Faktoren kommt.

Die Untersuchung der Gefäßentwicklung beim Hühnerembryo kann daher eine Brücke bilden zwischen den im Zebrafisch gewonnenen genetischen und molekularen Grundlagen, und deren Wirksamkeit auch in der Embryonalentwicklung höherer Wirbeltiere einschließlich des Menschen.

6 Literaturverzeichnis

1. Skromne, I. and C.D. Stern, *A hierarchy of gene expression accompanying induction of the primitive streak by Vg1 in the chick embryo*. Mech Dev, 2002. **114**(1-2): p. 115-8.
2. Solnica-Krezel, L. and D.S. Sepich, *Gastrulation: making and shaping germ layers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 687-717.
3. Stern, C.D., *Gastrulation: From Cells to Embryo*. 2004, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 219-232.
4. Schoenwolf, G.C., *Cell movements driving neurulation in avian embryos*. Dev Suppl, 1991. **Suppl 2**: p. 157-68.
5. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
6. Kimura, W., et al., *Fate and plasticity of the endoderm in the early chick embryo*. Dev Biol, 2006. **289**(2): p. 283-95.
7. Lawson, A. and G.C. Schoenwolf, *Epiblast and primitive-streak origins of the endoderm in the gastrulating chick embryo*. Development, 2003. **130**(15): p. 3491-501.
8. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. J Morphol, 1951. **88**(1): p. 49-92.
9. Voiculescu, O., *Movements of chick gastrulation*. Curr Top Dev Biol, 2020. **136**: p. 409-428.
10. Brown, J.M. and K.G. Storey, *A region of the vertebrate neural plate in which neighbouring cells can adopt neural or epidermal fates*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. 869-72.
11. Mathis, L., P.M. Kulesa, and S.E. Fraser, *FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen's node progression*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(6): p. 559-66.
12. Christ, B. and C.P. Ordahl, *Early stages of chick somite development*. Anat Embryol (Berl), 1995. **191**(5): p. 381-96.
13. Christ, B. and J. Wiltling, *From somites to vertebral column*. Ann Anat, 1992. **174**(1): p. 23-32.
14. Keynes, R.J. and C.D. Stern, *Mechanisms of vertebrate segmentation*. Development, 1988. **103**(3): p. 413-29.
15. Brand-Saberi, B., et al., *The ventralizing effect of the notochord on somite differentiation in chick embryos*. Anat Embryol (Berl), 1993. **188**(3): p. 239-45.
16. Goulding, M., A. Lumsden, and A.J. Paquette, *Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development*. Development, 1994. **120**(4): p. 957-71.
17. Goulding, M.D., A. Lumsden, and P. Gruss, *Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord*. Development, 1993. **117**(3): p. 1001-16.
18. Holtzer, H., *An experimental analysis of the development of the spinal column II The dispensability of the notochord*. J Exp Zool, 1952. **121**: p. 573 - 591.
19. Lash, J., S. Holtzer, and H. Holtzer, *An experimental analysis of the development of the spinal column. VI. Aspects of cartilage induction*. Exp Cell Res, 1957. **13**(2): p. 292-303.
20. Pourquie, O., et al., *Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5242-6.
21. Watterson, R.L., I. Fowler, and B.J. Fowler, *The role of the neural tube and notochord in development of the axial skeleton of the chick*. Am J Anat, 1954. **95**(3): p. 337-99.
22. Christ, B., H.J. Jacob, and M. Jacob, *[Experimental studies on the development of the thoracic wall in chick embryos]*. Experientia, 1974. **30**(12): p. 1449-51.

23. Chevallier, A., *Origine des ceintures scapulaires et pelviennes chez l'embryon d'oiseau*. J Embryol Exp Morphol, 1977. **42**: p. 275 - 292.
24. Christ, B., H.J. Jacob, and M. Jacob, *Differentiating abilities of avian somatopleural mesoderm*. Experientia, 1979. **35**(10): p. 1376-8.
25. Christ, B., et al., *On the origin, distribution and determination of avian limb mesenchymal cells*. Prog Clin Biol Res, 1982. **110 Pt B**: p. 281-91.
26. Wachtler, F., B. Christ, and H.J. Jacob, *On the determination of mesodermal tissues in the avian embryonic wing bud*. Anat Embryol (Berl), 1981. **161**(3): p. 283-9.
27. Wachtler, F., B. Christ, and H.J. Jacob, *Grafting experiments on determination and migratory behaviour of presomitic, somitic and somatopleural cells in avian embryos*. Anat Embryol (Berl), 1982. **164**(3): p. 369-78.
28. Lash, J., *Studies on the ability of embryonic mesonephros explants to form cartilage*. Dev Biol, 1963. **6**: p. 219-232.
29. Pourquie, O., *Notch around the clock*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(5): p. 559-65.
30. Bellairs, R., *The Development of Somites in the Chick Embryo*. J Embryol Exp Morphol, 1963. **11**: p. 697-714.
31. Bellairs, R., *The mechanism of somite segmentation in the chick embryo*. J Embryol Exp Morphol, 1979. **51**: p. 227-43.
32. Christ, B., H.J. Jacob, and M. Jacob, *[Experimental analysis of somitogenesis in the chick embryo]*. Z Anat Entwicklungsgesch, 1972. **138**(1): p. 82-97.
33. Christ, B., M. Jacob, and H.J. Jacob, *Weitere Befunde zur Differenzierung des achsennahen Mesoderms junger Hühnerembryonen*. Anat Anz Ergänzt-H. zum Bd, 1973. **134**: p. 175-182.
34. Menkes, B. and S. Sandor, *Somitogenesis: regulation potencies, sequence determination and primordial interactions*. British Society for developmental biology, ed. D.A. Ede, J.R. Hinchliffe, and M. Balls. 1977, Cambridge: Cambridge University Press.
35. Packard, D.J., *Chick somite determination: the role of factors in young somites and the segmental plate*. J Exp Zool, 1978. **203**: p. 295-306.
36. Solursh, M., et al., *The role of extracellular matrix in the formation of the sclerotome*. J Embryol Exp Morphol, 1979. **54**: p. 75-98.
37. Jacob, M., J.H. Jacob, and B. Christ, *[The early differentiation of the perinotochordal connective tissue. A scanning and transmission electron microscopic study on chick embryos (author's transl)]*. Experientia, 1975. **31**(9): p. 1083-6.
38. Olivera-Martinez, I., et al., *Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras*. Development, 2000. **127**(21): p. 4611-7.
39. Ebensperger, C., et al., *Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos*. Anat Embryol (Berl), 1995. **191**(4): p. 297-310.
40. Koseki, H., et al., *A role for Pax-1 as a mediator of notochordal signals during the dorsoventral specification of vertebrae*. Development, 1993. **119**(3): p. 649-660.
41. Echelard, Y., et al., *Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1417-1430.
42. Riddle, R.D., et al., *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1401-1416.
43. Johnson, R.L., et al., *Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1165-73.
44. Muller, T.S., et al., *Expression of avian Pax1 and Pax9 is intrinsically regulated in the pharyngeal endoderm, but depends on environmental influences in the paraxial mesoderm*. Dev Biol, 1996. **178**(2): p. 403-17.
45. Wagner, J., et al., *Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by wnt expression*. Dev Biol, 2000. **228**(1): p. 86-94.
46. Lee, C.S., L. Buttitta, and C.M. Fan, *Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11347-52.

47. Lee, C.S., et al., *SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm*. *Development*, 2000. **127**(1): p. 109-18.
48. Fan, C.M., et al., *Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway*. *Cell*, 1995. **81**(3): p. 457-65.
49. Stolte, D., R. Huang, and B. Christ, *Spatial and temporal pattern of Fgf-8 expression during chicken development*. *Anat Embryol (Berl)*, 2002. **205**(1): p. 1-6.
50. Teillet, M., et al., *Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages*. *Development*, 1998. **125**(11): p. 2019-30.
51. Wilting, J., et al., *Pax-1 in the development of the cervico-occipital transitional zone*. *Anat Embryol (Berl)*, 1995. **192**(3): p. 221-7.
52. Huang, R., et al., *Ventral axial organs regulate expression of myotomal Fgf-8 that influences rib development*. *Dev Biol*, 2003. **255**(1): p. 30-47.
53. Pourquie, O., et al., *Control of somite patterning by signals from the lateral plate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(8): p. 3219-23.
54. Pourquie, O., et al., *Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4*. *Cell*, 1996. **84**(3): p. 461-71.
55. Brent, A.E., R. Schweitzer, and C.J. Tabin, *A somitic compartment of tendon progenitors*. *Cell*, 2003. **113**(2): p. 235-48.
56. Huang, R., et al., *New experimental evidence for somite resegmentation*. *Anat Embryol (Berl)*, 2000. **202**(3): p. 195-200.
57. Huang, R., et al., *The fate of somitocoele cells in avian embryos*. *Anat Embryol (Berl)*, 1994. **190**(3): p. 243-50.
58. Eichmann, A., et al., *Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development*. *Mech Dev*, 1993. **42**(1-2): p. 33-48.
59. Nimmagadda, S., et al., *BMP4 and noggin control embryonic blood vessel formation by antagonistic regulation of VEGFR-2 (Quek1) expression*. *Dev Biol*, 2005. **280**(1): p. 100-10.
60. Wilting, J., et al., *Development of the embryonic vascular system*. *Cell Mol Biol Res*, 1995. **41**(4): p. 219-32.
61. Christ, B., R. Huang, and M. Scaal, *Formation and differentiation of the avian sclerotome*. *Anat Embryol (Berl)*, 2004. **208**(5): p. 333-50.
62. Chen, Z.F. and R.R. Behringer, *twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis*. *Genes Dev*, 1995. **9**(6): p. 686-99.
63. Christ, B., R. Huang, and J. Wilting, *The development of the avian vertebral column*. *Anat Embryol (Berl)*, 2000. **202**(3): p. 179-94.
64. Hornik, C., et al., *Twist is an integrator of SHH, FGF, and BMP signaling*. *Anat Embryol (Berl)*, 2004. **209**(1): p. 31-9.
65. Kaestner, K.H., et al., *Clustered arrangement of winged helix genes fkh-6 and MFH-1: possible implications for mesoderm development*. *Development*, 1996. **122**(6): p. 1751-8.
66. Miura, N., et al., *MFH-1, a new member of the fork head domain family, is expressed in developing mesenchyme*. *FEBS Lett*, 1993. **326**(1-3): p. 171-6.
67. Neubuser, A., H. Koseki, and R. Balling, *Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1*. *Dev Biol*, 1995. **170**(2): p. 701-16.
68. Wallin, J., et al., *The role of Pax-1 in axial skeleton development*. *Development*, 1994. **120**(5): p. 1109-21.
69. Winnier, G.E., L. Hargett, and B.L. Hogan, *The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo*. *Genes Dev*, 1997. **11**(7): p. 926-40.
70. Barnes, G.L., et al., *Chicken Pax-1 gene: structure and expression during embryonic somite development*. *Differentiation*, 1996. **61**(1): p. 13-23.

71. Buchberger, A., et al., *Chicken winged-helix transcription factor cFKH-1 prefigures axial and appendicular skeletal structures during chicken embryogenesis*. Dev Dyn, 1998. **212**(1): p. 94-101.
72. Bagnall, K.M., S.J. Higgins, and E.J. Sanders, *The contribution made by a single somite to the vertebral column: experimental evidence in support of resegmentation using the chick-quail chimaera model*. Development, 1988. **103**(1): p. 69-85.
73. Bagnall, K.M., S.J. Higgins, and E.J. Sanders, *The contribution made by cells from a single somite to tissues within a body segment and assessment of their integration with similar cells from adjacent segments*. Development, 1989. **107**(4): p. 931-43.
74. Ewan, K.B. and A.W. Everett, *Evidence for resegmentation in the formation of the vertebral column using the novel approach of retroviral-mediated gene transfer*. Exp Cell Res, 1992. **198**(2): p. 315-20.
75. Huang, R., et al., *Function of somite and somitocoel cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryos*. Acta Anat (Basel), 1996. **155**(4): p. 231-41.
76. Huang, R., et al., *Sclerotomal origin of the ribs*. Development, 2000. **127**(3): p. 527-32.
77. Ward, L., S.E. Evans, and C.D. Stern, *A resegmentation-shift model for vertebral patterning*. J Anat, 2017. **230**(2): p. 290-296.
78. Bell, D.M., et al., *SOX9 directly regulates the type-II collagen gene*. Nat Genet, 1997. **16**(2): p. 174-8.
79. Bi, W., et al., *Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6698-703.
80. Healy, C., D. Uwanogho, and P.T. Sharpe, *Expression of the chicken Sox9 gene marks the onset of cartilage differentiation*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **785**: p. 261-2.
81. Brown, D., et al., *Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis*. Development, 1999. **126**(19): p. 4317-29.
82. Cserjesi, P., et al., *Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis*. Development, 1995. **121**(4): p. 1099-110.
83. Schweitzer, R., et al., *Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments*. Development, 2001. **128**(19): p. 3855-66.
84. Blechschmidt, E., *Die vorgeburtliche Entwicklungsstadien des menschen*. 1961, Basel: Karger.
85. Wang, H.U. and D.J. Anderson, *Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth*. Neuron, 1997. **18**(3): p. 383-96.
86. Halata, Z., M. Grim, and B. Christ, *Origin of spinal cord meninges, sheaths of peripheral nerves, and cutaneous receptors including Merkel cells. An experimental and ultrastructural study with avian chimeras*. Anat Embryol (Berl), 1990. **182**(6): p. 529-37.
87. Marin, F. and M.A. Nieto, *Expression of chicken slug and snail in mesenchymal components of the developing central nervous system*. Dev Dyn, 2004. **230**(1): p. 144-8.
88. Nimmagadda, S., et al., *Expression pattern of VEGFR-2 (Quek1) during quail development*. Anat Embryol (Berl), 2004. **208**(3): p. 219-24.
89. Schuermann, A., C.S. Helker, and W. Herzog, *Angiogenesis in zebrafish*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **31**: p. 106-14.
90. Parker, L.H., et al., *The endothelial-cell-derived secreted factor Eglf7 regulates vascular tube formation*. Nature, 2004. **428**(6984): p. 754-8.
91. Hogan, K., et al., *The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway*. Development, 2003. **131**: p. 1503-1513.
92. Pardanaud, L., F. Yassine, and F. Dieterlen-Lievre, *Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny*. Development, 1989. **105**(3): p. 473-85.

93. Poole, T.J. and J.D. Coffin, *Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern*. J Exp Zool, 1989. **251**(2): p. 224-31.
94. Risau, W. and V. Lemmon, *Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis*. Dev Biol, 1988. **125**(2): p. 441-50.
95. Risau, W., et al., *Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies*. Development, 1988. **102**(3): p. 471-8.
96. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
97. Risau, W., *Embryonic angiogenesis factors*. Pharmacol Ther, 1991. **51**(3): p. 371-6.
98. Bär, T., *The vascular system of the cerebral cortex (Morphometrische Untersuchungen am Gefäßsystem der Hirnrinde, engl.) With 33 fig.* 1980.
99. Ekblom, P., et al., *The origin of the glomerular endothelium*. Cell differentiation, 1982. **11**(1): p. 35-39.
100. Feeney Jr, J.F. and R.L. Watterson, *The development of the vascular pattern within the walls of the central nervous system of the chick embryo*. Journal of Morphology, 1946. **78**(2): p. 231-303.
101. Stewart, P. and M. Wiley, *Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras*. Developmental biology, 1981. **84**(1): p. 183-192.
102. Kimelman, D. and M. Kirschner, *Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early Xenopus embryo*. Cell, 1987. **51**(5): p. 869-77.
103. Slack, J.M., et al., *Mesoderm induction in early Xenopus embryos by heparin-binding growth factors*. Nature, 1987. **326**(6109): p. 197-200.
104. Woodland, H.R., *Mesoderm formation in Xenopus*. Cell, 1989. **59**(5): p. 767-70.
105. Axnick, J. and E. Lammert, *Vascular lumen formation*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(3): p. 192-8.
106. Ellertsdottir, E., et al., *Vascular morphogenesis in the zebrafish embryo*. Dev Biol, 2010. **341**(1): p. 56-65.
107. Jin, S.W., et al., *Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish*. Development, 2005. **132**(23): p. 5199-209.
108. Sato, Y., *Dorsal aorta formation: separate origins, lateral-to-medial migration, and remodeling*. Dev Growth Differ, 2013. **55**(1): p. 113-29.
109. Swift, M.R. and B.M. Weinstein, *Arterial-venous specification during development*. Circ Res, 2009. **104**(5): p. 576-88.
110. Garriock, R.J. and T. Mikawa, *Early arterial differentiation and patterning in the avian embryo model*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(9): p. 985-92.
111. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
112. Kurz, H., et al., *First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells*. Dev Biol, 1996. **173**(1): p. 133-47.
113. Bentley, K., et al., *The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(4): p. 309-21.
114. Jakobsson, L., et al., *Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(10): p. 943-53.
115. Lenard, A., et al., *In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis*. Dev Cell, 2013. **25**(5): p. 492-506.
116. Herwig, L., et al., *Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo*. Curr Biol, 2011. **21**(22): p. 1942-8.
117. Yokota, Y., et al., *Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo*. Elife, 2015. **4**.
118. Phng, L.K., F. Stanchi, and H. Gerhardt, *Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance*. Development, 2013. **140**(19): p. 4031-40.

119. Childs, S., et al., *Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo*. Development, 2002. **129**(4): p. 973-82.
120. Tobia, C., et al., *Zebrafish embryo intersegmental vessels: a tool for investigating sprouting angiogenesis*. Methods Mol Biol, 2015. **1214**: p. 173-84.
121. Hasan, S.S. and A.F. Siekmann, *The same but different: signaling pathways in control of endothelial cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 86-92.
122. Moran, C.M., et al., *Hedgehog regulates angiogenesis of intersegmental vessels through the VEGF signaling pathway*. Dev Dyn, 2012. **241**(6): p. 1034-42.
123. Coultas, L., et al., *Hedgehog regulates distinct vascular patterning events through VEGF-dependent and -independent mechanisms*. Blood, 2010. **116**(4): p. 653-60.
124. Pola, R., et al., *The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 706-11.
125. White, A.C., K.J. Lavine, and D.M. Ornitz, *FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network*. Development, 2007. **134**(20): p. 3743-52.
126. Korn, C. and H.G. Augustin, *Mechanisms of Vessel Pruning and Regression*. Dev Cell, 2015. **34**(1): p. 5-17.
127. Ricard, N. and M. Simons, *When it is better to regress: dynamics of vascular pruning*. PLoS Biol, 2015. **13**(5): p. e1002148.
128. Chen, Q., et al., *Haemodynamics-driven developmental pruning of brain vasculature in zebrafish*. PLoS Biol, 2012. **10**(8): p. e1001374.
129. Needham, J., *A History of Embryology*. 1959, New York: Abelard-Schuman.
130. Bressan, M. and T. Mikawa, *Avians as a model system of vascular development*. Methods Mol Biol, 2015. **1214**: p. 225-42.
131. Ghaffari, S., R.L. Leask, and E.A. Jones, *Simultaneous imaging of blood flow dynamics and vascular remodelling during development*. Development, 2015. **142**(23): p. 4158-67.
132. Ribatti, D., et al., *The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(6): p. 1189-97.
133. Coffin, J.D. and T.J. Poole, *Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos*. Development, 1988. **102**(4): p. 735-48.
134. Noden, D.M., *Embryonic origins and assembly of blood vessels*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(4): p. 1097-103.
135. Pardanaud, L., et al., *Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis*. Development, 1996. **122**(5): p. 1363-71.
136. Rawles, M., *Physiological Zoology*. Physiological Zoology, 1943. **16**: p. 22-43.
137. Stalsberg, H. and R.L. DeHaan, *The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo*. Dev Biol, 1969. **19**(2): p. 128-59.
138. Creuzet, S., G. Couly, and N.M. Le Douarin, *Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies*. J Anat, 2005. **207**(5): p. 447-59.
139. Hatada, Y. and C.D. Stern, *A fate map of the epiblast of the early chick embryo*. Development, 1994. **120**(10): p. 2879-89.
140. Isogai, S., M. Horiguchi, and B.M. Weinstein, *The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development*. Dev Biol, 2001. **230**(2): p. 278-301.
141. Ozguner, G. and O. Sulak, *Development of the abdominal aorta and iliac arteries during the fetal period: a morphometric study*. Surg Radiol Anat, 2011. **33**(1): p. 35-43.
142. Wintrich, T., M. Scaal, and P.M. Sanders, *Foramina in plesiosaur cervical centra indicate a specialized vascular system*. Foss. Rec., 2017. **20**: p. 279-290.
143. Aoyama, H. and K. Asamoto, *The developmental fate of the rostral/caudal half of a somite for vertebra and rib formation: experimental confirmation of the resegmentation theory using chick-quail chimeras*. Mech Dev, 2000. **99**(1-2): p. 71-82.
144. Evans, D.J., *Contribution of somitic cells to the avian ribs*. Dev Biol, 2003. **256**(1): p. 114-26.

145. Li, Y., et al., *Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye Dil*. Nat Protoc, 2008. **3**(11): p. 1703-8.
146. Lefebvre, V., M. Angelozzi, and A. Haseeb, *SOX9 in cartilage development and disease*. Curr Opin Cell Biol, 2019. **61**: p. 39-47.
147. Liu, C.-F., et al. *Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2017. Elsevier.
148. Evans, H.M., *On the development of the aortae, cardinal and umbilical veins, and the other blood vessels of vertebrate embryos from capillaries*. The Anatomical Record, 1909. **3**(9): p. 498-518.
149. Felix, W., *Zur Entwicklungsgeschichte der Rumpfarterien des menschlichen Embryo*. Gegenbaurs Morphol Jahrb, 1910. **41**: p. 577-614.
150. Romanoff, A.L., *The avian embryo: structural and functional development*. The avian embryo: structural and functional development., 1960.
151. Sabin, F.R., *Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig*. 1917.
152. Coffin, J.D. and T.J. Poole, *Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos*. Development, 1988. **102**(4): p. 735-748.
153. Isogai, S., et al., *Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk*. Development, 2003. **130**(21): p. 5281-90.
154. Bohme, K., et al., *Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine*. J Cell Biol, 1992. **116**(4): p. 1035-42.
155. Akiyama, H., et al., *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2813-28.
156. Yasuda, H., et al., *A novel regulatory mechanism of type II collagen expression via a SOX9-dependent enhancer in intron 6*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(2): p. 528-538.
157. Ouarné, M., A. Pena, and C.A. Franco, *From remodeling to quiescence: the transformation of the vascular network*. Cells & Development, 2021. **168**: p. 203735.
158. Schummer, A. and R. Nickel, *Anatomie der Hausvogel*. 1973: Parey.
159. Schauinsland, H., *Die Entwicklung der Wirbelsäule nebst Rippen und Brustbein*. (No Title), 1906.
160. Nanka, O., et al., *Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis*. Dev Dyn, 2006. **235**(3): p. 723-33.
161. Tongers, J., J.G. Roncalli, and D.W. Losordo, *Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation*. Microvascular research, 2010. **79**(3): p. 200-206.
162. Kung, A.L., et al., *Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription*. Nature medicine, 2000. **6**(12): p. 1335-1340.
163. Ryan, H.E., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth*. Cancer research, 2000. **60**(15): p. 4010-4015.
164. Schipani, E., et al., *Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival*. Genes & development, 2001. **15**(21): p. 2865-2876.
165. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annual review of cell and developmental biology, 1999. **15**(1): p. 551-578.
166. Cannon, J.E., et al., *Intersegmental vessel formation in zebrafish: requirement for VEGF but not BMP signalling revealed by selective and non-selective BMP antagonists*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(1): p. 140-9.

7 Anhang

Abbildung 1 Bildung des Primitivstreifens während der Gastrulation im transversalen Schnitt	13
Abbildung 2 Differenzierung des Mesoderm in verschiedene Kompartimente (A, B) und dadurch Bildung von Somiten aus paraxialem Mesoderm (C).....	15
Abbildung 3 Entstehung neuer Somiten in kranio-kaudaler Richtung.....	16
Abbildung 4 Transversalschnitt zur Darstellung der Somiten-Kompartimentierung mit Unterteilung in Sklerotom und Dermomyotom.....	17
Abbildung 5 Darstellung der Entstehung einer Wirbelanlage aus Anteilen zweier benachbarter Somiten.....	19
Abbildung 6 Entstehung der Intersegmentalgefäße aus der dorsalen Aorta	22
Abbildung 7 Injektion in Herzhöhle bei einem HH20 Wholemount-Embryo.....	27
Abbildung 8 Ablauf zur Präparation der Transversalschnitte	28
Abbildung 9 Anfertigung der Schnitte mit Einteilung in thorakal und lumbal	29
Abbildung 10 Darstellung eines Wholemount-Hühnerembryos in Stadium HH 16/17	39
Abbildung 11 Darstellung der mit Dil-markierten Gefäßverläufe und der umliegenden Strukturen im Wholemount, sowie in Transversalebene bei Stadium HH 20	40
Abbildung 12 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 19 – HH 22 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem thorakalen Bereich	45
Abbildung 13 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 23 – HH 26 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem thorakalen Bereich: die arteriellen und venösen Gefäßverläufe sind sichtbar	46
Abbildung 14 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 27 – HH 30 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem thorakalen Bereich.....	47
Abbildung 15 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 19 – HH 22 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem lumbalen Bereich	48
Abbildung 16 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 23 – HH 26 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem lumbalen Bereich	49
Abbildung 17 Darstellung der Dil-markierten Transversalschnitte der Stadien HH 27 – HH 30 und dazugehörige schematische Darstellung aus dem lumbalen Bereich	50
Abbildung 18 Nahaufnahmen der Stadien HH 23 und HH 24.....	51
Abbildung 19 Schematischer Überblick der Transversalschnitte aus dem thorakalen Bereich der Stadien HH 19 – HH 30	52
Abbildung 20 Schematischer Überblick der Transversalschnitte aus dem lumbalen Bereich der Stadien HH 19 – HH 30.....	53
Abbildung 21 Ergebnisse der Dil-markierten Gefäße, sowie IHC der Knorpelprogenitorzellen bei Transversalschnitten der Stadien HH 20, HH 21.....	55

Abbildung 22 Ergebnisse der mit Dil-markierten Gefäße, sowie IHC der Knorpelprogenitorzellen bei Transversalschnitten der Stadien HH 26 – HH 28.....	58
Abbildung 23 Dil-Injektion der Gefäße und IHC der Knorpelprogenitorzellen bei Transversalschnitten der Stadien HH 29 – HH 30	59
Abbildung 24 Nahaufnahmen von Transversalschnitten der Stadien HH 28 nach Dil-Injektion und IHC gegen Sox9.....	60
Abbildung 25 Schematische Ergänzung zum Verlauf der ISG in Zusammenhang mit der Entwicklung chondrogener Strukturen bei den Stadien HH 21 und HH 30	61
Abbildung 26 Vibratom-Schnitte von Stadium HH 30 in Transversalebene nach Dil-Injektion, sowie im Durchlicht mit Phasenkontrast zur Darstellung der unterschiedlichen Gewebestrukturen.....	63
Abbildung 27 Grafische Darstellung der Resegmentierung in verschiedenen Ebenen.....	67
Abbildung 28 Grafische Darstellung der Transversalschnitte der wichtigsten Entwicklungsschritte HH 21, HH 24 und HH 28 mit Dil- sowie Sox9-Markierung	68