

Aus dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock

Leiter: PD Dr. sc. nat. Marcus Frank

**Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen  
der Lungenentwicklung mit epithelialen und  
mesenchymalen Markern im embryonalen Haushuhn  
(*Gallus gallus domesticus*)**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Martha Anett Greulich, geboren am 03.01.1984 in Gera  
aus Rostock

Rostock, den 19. Juli 2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0  
International Lizenz.

Gutachter:

1. Gutachter: PD Dr. sc. nat. habil. Marcus Frank

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Witt

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hartwig Wolburg

Datum der Einreichung: 19. Juli 2019

Datum der Verteidigung: 12. Februar 2020

FÜR MEINE KINDER  
FEDOR UND ADINA,  
DIE MIR UNERMÜDLICH ZEIGEN  
WAS DAS LEBEN  
MIR ALLES SCHENKEN KANN.

# Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Dr. Markus Frank für die stets freundliche Betreuung, die vielen kreativen Ideen und das mir gegebene Vertrauen diese Arbeit zu bewerkstelligen. Ebenso verdanke ich ihm, dass ich einen Einblick in die faszinierenden Techniken der Transmissions- und der Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie im Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock erhalten habe.

Ein besonderer Dank geht an Frau Ute Schulz, die mit großer Geduld und Fürsorge mir die Probenpräparation und Ultramikrotomie lehrte und stets mich in Problemlösungen innerhalb und außerhalb des Labors unterstützte.

Herrn Fulda und Herrn Labs danke ich sehr für die Unterstützung in allen technischen Fragen und für die verlässliche Betreuung und in Gang Haltung der kleinen und großen Geräte des Zentrums.

Ich bedanke mich bei meiner Kollegin Frau Elisabeth Hempel für ihre Aufmerksamkeit, Gesellschaft und die Herstellung und Bereitstellung der immunhistologischen Paraffinschnitte der embryonalen Vogellunge, die meine elektronenmikroskopischen Bilder ergänzen.

Methodische Hinweise und stets ein offenes Ohr erhielt ich von Dr. Burkhard Krüger und seinem Team. Vielen Dank dafür.

Ich danke allen Menschen, die diese Arbeit zur Korrektur lasen für ihre Geduld mit meinem schriftlichen Ausdruck und die wertvollen Rückmeldungen.

Meiner Familie danke ich für die bedingungslose finanzielle und ideelle Unterstützung, die mein Studium und meine Promotion erst möglich machte.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Buttkewitz und die Graduiertenakademie. Durch ihre Unterstützung konnte ich an interessanten und hilfreichen Kursen teilnehmen.

Den Kinderfrauen und der organisatorischen Leitung von fambeKi e.V. danke ich für die liebevolle Betreuung meiner Kinder, um mir so den nötigen zeitlichen Freiraum für diese Arbeit zu ermöglichen.

Ich danke herzlich allen Freunden, Weggefährten und Menschen für die liebevollen Begegnungen und aufmunternden Kontakte.

Abschließend möchte ich dem Menschen danken, ohne den ich diese Arbeit schon in einem frühen Stadium aufgegeben hätte. Dr. Ulf Gausmann gab mir sehr viel Kraft und Mut durch die Gespräche mit ihm und brachte mich durch manch psychologischen Schubs weiter. Ich danke dir dafür Ulf.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Vorwort</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1 Die Vogellunge .....	2
2.1.1 Der Aufbau der Lunge.....	3
2.1.2 Die Luftsäcke und die Funktion der Lunge.....	9
2.2 Die embryonale Entwicklung des Atemorgansystems .....	13
2.2.1 Die embryonale Entwicklung der Vögel .....	13
2.2.2 Die Entwicklung der Lunge und der Luftsäcke.....	14
2.2.3 Die Entwicklung des Epithels und des Gasaustauschgewebes .....	16
2.2.4 Die Steuerung der embryonalen Lungenentwicklung .....	18
2.3 Die Marker und ihre Strukturen .....	23
2.3.1 Die Zellkontakte und das E-Cadherin .....	23
2.3.2 Der Zellkern und der Transkriptionsfaktor SOX 2 .....	26
2.3.3 Die glatte Muskulatur und das glattmuskuläre Aktin.....	28
2.3.4 Die Basallamina und das Laminin .....	30
<b>3 Zielstellung der Arbeit</b> .....	<b>32</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
4.1 Die Herstellung der Präparate .....	34
4.2 Die Immunogoldmarkierung .....	37
4.3 Die Auswertung.....	39
<b>5 Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
5.1 Die Anatomie und Histologie.....	41
5.2 Der elektronenmikroskopische Aufbau.....	49
5.2.1 Der elektronenmikroskopische Aufbau im Entwicklungsstadium E10 .....	49
5.2.2 Der elektronenmikroskopische Aufbau in den Entwicklungsstadien E12 und E14..	52

---

5.2.3 Der elektronenmikroskopische Aufbau im Entwicklungsstadium E16 und der Blut-Luft-Schranke.....	55
5.2.4 Die Transformation des Epithels und epithelial-mesenchymale Kontakte .....	58
5.3 Die Immunmarkierungen .....	63
5.3.1 Die Markierung mit Anti-E-Cadherin-Antikörpern .....	63
5.3.2 Die Markierung mit Anti-SOX2-Antikörpern.....	67
5.3.3 Die Markierung mit Anti- alpha – smooth muscle actin -Antikörpern.....	71
5.3.4 Die Markierung mit Anti-Laminin-Antikörpern .....	75
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>78</b>
6.1 Das Untersuchungsmodell und die Methode.....	78
6.2 Die Anatomie und Histologie.....	80
6.3 Der elektronenmikroskopische Aufbau.....	82
6.4 Die Immunmarkierungen .....	86
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>
<b>8 Thesen.....</b>	<b>94</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XV</b>
<b>Anhangsverzeichnis.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>XVII</b>

# 1 Vorwort

Am 29. November 1973 kollidierte ein Sperbergeier, *Gyps rueppellii*, in eine Höhe von 11,3 Kilometern mit einem Flugzeug über der Elfenbeinküste in Afrika (Laybourne 1974). Der Luftdruck beträgt in dieser Höhe circa 20% des Druckes auf Meereshöhe und die Temperatur circa -60 Grad Celsius. Auf ihrer jährlichen Reise zwischen Brut- und Wintergebieten überqueren Streifengänse, *Anser indicus*, in einer Höhe von 8,8 Kilometern in einem ununterbrochenen Flug den Mount Everest (Lincoln 1999). Für uns Menschen ist es schwer vorstellbar in dieser Höhe zu überleben oder gar selbst zu fliegen. Wie erreichen Vögel scheinbar mühelos solche Leistungen?

Vögel unterscheiden sich viel mehr von Säugetieren, als man auf den ersten Blick vermutet. Nicht nur, dass sie Flügel, Federn und einen sehr leichten Skelettbau haben. Sie besitzen auch ein in seiner Bau- und Funktionsweise grundsätzlich anderes und wesentlich effizienteres Atmungsorgansystem. Der besondere Bau der Vogellunge ist mitverantwortlich für die zuvor beschriebenen Extremleistungen und ermöglicht das Fliegen selbst in mehreren Kilometern Höhe.

Wie in den folgenden Kapiteln näher beschrieben wird, ist das Atmungsorgan der Vögel äußerst komplex und differenziert entwickelt. Ein Vogelei, der Ursprung eines jeden Vogels, ist für den unerfahrenen Betrachter von sehr primitivem Aufbau. Daraus stellt sich die Frage wie aus einer so einfachen Einheit, wie dem Ei, ein so faszinierendes Geschöpf eines flugfähigen Vogels entstehen kann. Die Aspekte dieses Werdeganges sind unzählig und selbst ein eingeschränkter Blick auf die Entwicklung der Vogellunge beinhaltet noch Forschungspotential für viele Generationen. Um einen kleinen Beitrag zur Erklärung dieses Rätsels zu geben, wurden in dieser Arbeit einige Punkte der Embryonalentwicklung der Vogellunge mit Hilfe der Techniken der Elektronenmikroskopie beleuchtet. Auch wenn das Haushuhn, *Gallus gallus domesticus*, nicht für seine exzellente Flugfähigkeit bekannt ist, sind seine Eier doch leicht zu beziehen und mit wenig Aufwand zu bebrüten. Deshalb soll es auch hier, wie für viele vorangegangene Arbeiten, als bewährter Modellorganismus und Vertreter der Klasse der Vögel dienen.

## 2 Einleitung

Zum grundlegenden Verständnis wird folgend zuerst Bau und Funktionsweise des Atemorgansystems der ausgewachsenen Vögel dargestellt, anschließend die bisher bekannten Aspekte der embryonalen Entwicklung der Vogellunge erläutert und zuletzt auf die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Immunmarker eingegangen.

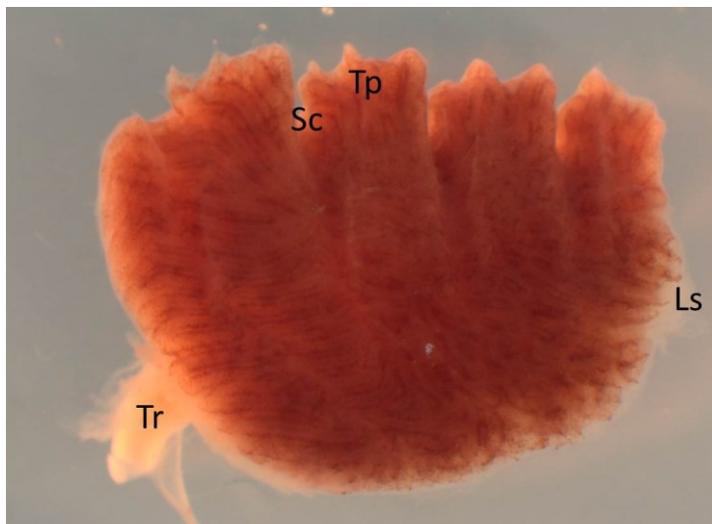
### 2.1 Die Vogellunge

Das Atmungsorgan der Vögel gliedert sich in einen Luft leitenden Ventilationsapparat und die eigentliche Lunge, das Respirationsorgan. Der Ventilationsapparat besteht aus der Trachea, den großen Bronchien und mehreren Luftsäcken, die spezifisch für die Vögel sind und eine effiziente Belüftung der Lunge erlauben. So erreichen Vögel im Vergleich zu Säugern bei einem Dreiviertel des Lungenvolumens eine Gasaustauschfläche, die um 15% größer ist (Makanya et al. 2011a). Im Unterschied zu der konstanten dichotomen Verzweigung der bronchioalveolären Lungenarchitektur der Säuger ist die Lunge der Vögel dreistufig, in primäre, sekundäre und tertiäre (Para-) Bronchien aufgeteilt, die anders als bei den Säugern nicht blind enden. Deshalb sind die Funktionsweise und der Bau des Atemorgansystems der Vögel grundsätzlich verschieden zu dem bekannten Atemorgan der Säugetiere. Das Gasaustauschgewebe der Vogellunge wird durch parallel laufende Luftpfefen, die sogenannten Parabronchien, erschlossen. Diese werden in der Regel in einer immer gleichen Richtung von Frischluft durchströmt. Die Anordnung der Luftsäcke und die großen Bronchien gewährleisten diesen unidirektionalen Luftstrom. Im Folgenden wird sowohl die makroskopische, als auch die mikroskopische Anatomie des Atemorgans der Vögel sowie Aspekte der Physiologie der Vogelatmung beschrieben. In Bezug zum Thema dieser Arbeit wird dabei der Schwerpunkt auf den Ort des eigentlichen Gasaustausches, die Parabronchien, gelegt.

### 2.1.1 Der Aufbau der Lunge

Die Trachea der Vögel beginnt unterhalb der Epiglottis und geht an der Bifurkation in die beiden extrapulmonalen primären Bronchien über. Vor der Bifurkation in die Lungenhälften liegt die Syrinx, eine vogelspezifische knorpelige Struktur, die den mannigfaltigen Gesang mancher Vögel ermöglicht (Nickel et al 1992). Nach der Verzweigung treten die primären Bronchien medial durch den Hilus jeweils in die rechte und die linke Lunge ein und werden dann als intrapulmonale primäre Bronchien oder Hauptbronchien bezeichnet. Sie durchziehen die Lunge von kranial nach kaudal, um in die beiden großen abdominalen Luftsäcke überzugehen (Nickel et al. 1992; Maina 2005).

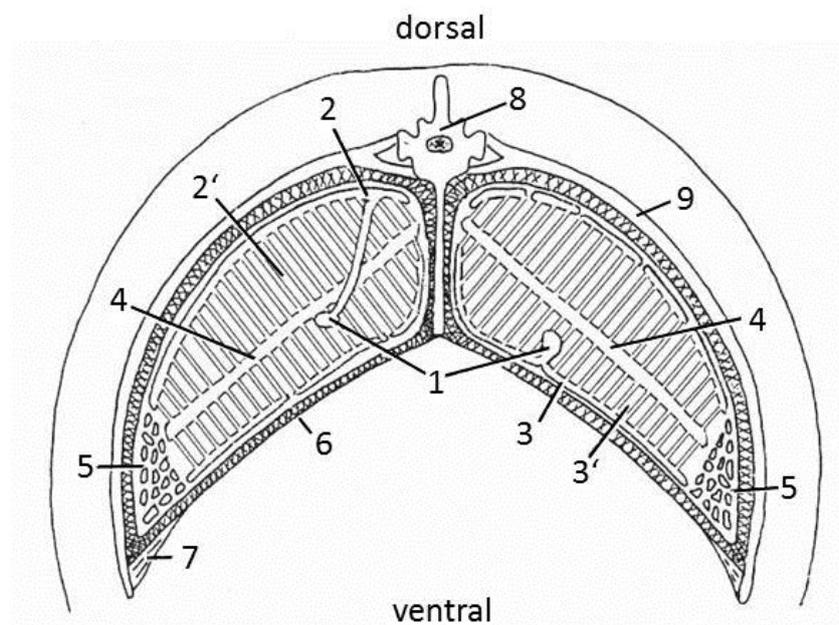
Die volumenkonstanten Lungen liegen dorsal beidseits der Wirbelsäule im Brustkorb und sind fest mit den Rippen verwachsen (siehe Abb. 1). Diese Verbindung wird durch das Bindegewebe der *Facies costalis* hergestellt. Die *Facies costalis* wird von tiefen Furchen, *Sulci costales*, durchzogen, in denen die Rippen verlaufen. In die Interkostalräume erheben sich umgekehrt Vorwölbungen der Lunge, die *Tori pulmonales*. Medial begrenzt die *Facies vertebralis* an der Wirbelsäule und kaudal die *Facies septalis* am horizontalen Septum mit dem *Hilus pulmonalis* das Lungengewebe (Salomon 1993; Maina 2005). Die Trachea und die großen Hauptbronchien sind histologisch ähnlich den Verhältnissen bei Säugern aufgebaut und sollen hier nur kurz beschrieben werden. Innen liegt ein einschichtiges Zylinderepithel mit Flimmer- und Becherzellen. Darunter sind einfache und verzweigte Drüsen, die ein Drüsenstratum bilden und auf die sich das Bindegewebe der Schleimhaut legt. Schließlich sind die Submucosa, hyaline Knorpelspangen und Muskelgewebe vorhanden (Kolb 1991; Nickel et al. 1992). Der Knorpel der Trachea ist ringförmig, wobei die intrapulmonalen primären Bronchien C-förmige Knorpelspangen haben (Maina 2000).



**Abbildung 1:**

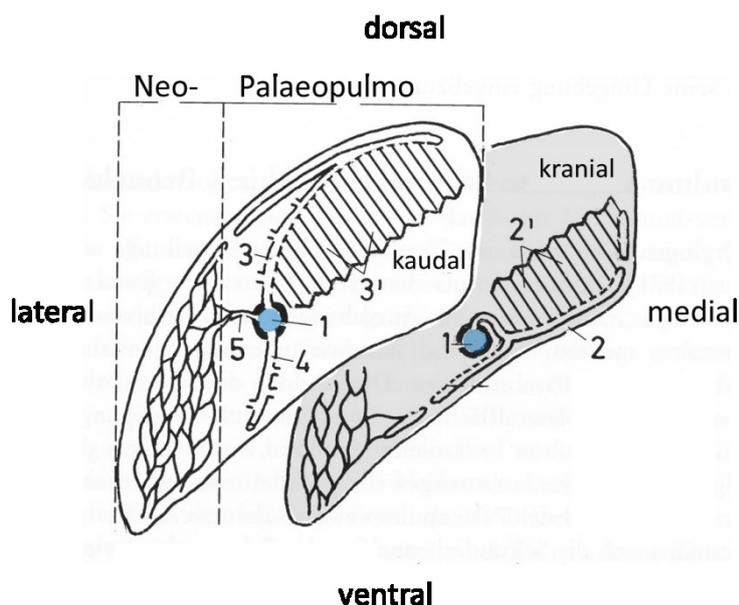
Lupenmikroskopische Aufnahme einer linken Hühnerlunge im Entwicklungsstadium E14, mit sichtbarem Ansatz der Trachea (Tr), des abdominalen Luftsackes (Ls), der *Sulci costales* (Sc) und *Tori pulmonales* (Tp).

In den Lungen geben die beiden primären Bronchien zahlreiche sekundäre Bronchien ab und gehen kaudal in die beiden großen abdominalen Luftsäcke über (Starck 1982; Maina 2005). Im Folgenden wird die allgemeine Situation bei Vögeln, sodann die Verhältnisse beim Haushuhn beschrieben. Nach Starck (1982) gehen in der Lunge zunächst vier Ventrobronchien (entsprechend den Medioventrobronchien) als sekundäre Bronchien vom Hauptbronchus ab (siehe Abb. 2). Sie treten an der dorsomedialen Wand des ersten Drittels des primären Bronchus aus und ziehen von dort auf die ventrale, mediale und teilweise dorsale Seite der Lunge und gehen schließlich in die vorderen Luftsäcke über (Starck 1982; Maina 2005). Nächstens folgen sechs bis zehn Dorsobronchien (entsprechend den Mediodorsobronchien), die von der dorsalen Wand des Hauptbronchus ausgehen und sich ohne Kontakt zu Luftsäcken auf die dorsolaterale und mediale Lunge ausbreiten.



**Abbildung 2:** Schematisierte und idealisierte Darstellung eines Querschnittes durch die Vogellunge, links einen Mediodorsobronchus, rechts einen Medioventrobronchus treffend. 1 primäre (Haupt-)Bronchien, 2 Mediodorsobronchus, 2' von diesem ausgehende Parabronchien, 3 Medioventrobronchus, 3' von diesem ausgehende Parabronchien, 4 *Planum anastomaticum*, 5 Parabronchien des Neopulmo, 6 Septum horizontale, 7 Teil der *Mm. costoseptales*, 8 Wirbelkörper, 9 Rippen. Abbildung modifiziert nach Nickel et al (1992).

Den Dorsobronchien gegenüber liegend haben am Hauptbronchus die etwa acht Lateroventrobronchien (Laterobronchien) ventral ihren Ursprung (siehe Abb. 3), von denen die erste oder zweite in den postthorakalen Luftsack übergeht (Nickel et al. 1992; Starck 1982; Salomon 1993). Die bis zu 25 laterodorsalen Bronchien gehen jeweils aus derselben Höhe von der lateralen Wand des primären Bronchus ab. Sie ziehen nach lateral und haben zum Teil nur einen kleinen Durchmesser ähnlich den Parabronchien (siehe unten). Sie weisen die höchsten Unterschiede zwischen den verschiedenen Vogelarten auf (Nickel et al. 1992; Salomon 1993; Maina 2005). Beim Haushuhn sind nach Makanya entsprechend vier medioventrale Bronchien, sieben bis zehn laterodorsale Bronchien, eins bis drei lateroventrale Bronchien, und 20 bis 60 posteriore sekundäre Bronchien vorhanden (Makanya und Djonov 2008). Die sekundären Bronchien laufen zumeist unter der Lungenoberfläche und haben eine dünne, knorpelfreie Wand. Aus den sekundären Bronchien gehen die tertiären oder Parabronchien hervor (Starck 1982), die am Ansatz weiter verzweigt sind (Makanya und Djonov 2008). Die Sekundärbronchien sind distal, wie die unten beschriebenen Parabronchien, mit einem flachen einschichtigen Epithel ausgekleidet. Proximal ähnelt ihr Epithel dem der primären Bronchien. Der Übergang zwischen den verschiedenen Typen der Epithelien ist nicht kontinuierlich, sondern eher scharf (Maina 2005).

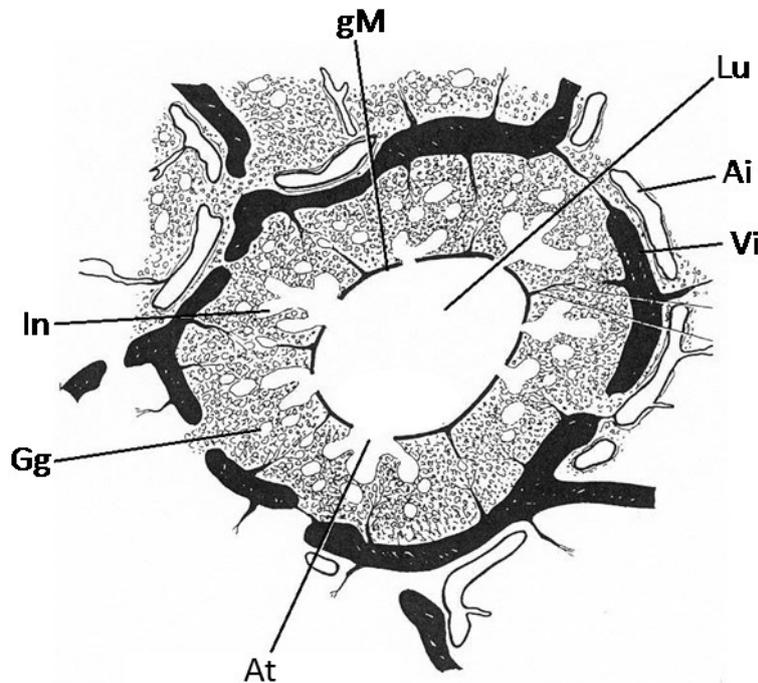


**Abbildung 3:** Schematisierte Darstellung der Bronchien anhand eines kranialen und eines kaudalen Querschnittes einer linken Lunge.

1 Hauptbronchus,  
 2 Medioventrobronchus mit seinen Parabronchien (2'),  
 3 Mediodorsobronchus mit seinen Parabronchien (3'),  
 4 Lateroventrobronchien,  
 5 Laterodorsobronchien.  
 Abbildung modifiziert nach Nickel und Kollegen (1992).

Die großen Gefäße, die Lungenarterie und -vene treten ebenfalls am Hilus ein und aus. Sie verzweigen sich jedoch nicht parallel der Bronchien. Aus der *Arteria pulmonalis* gehen in der Lunge vier Hauptäste ab. Im weiteren Verlauf gibt jeder der vier Hauptäste die *Arteriae interparabronchiales* ab, die entlang der interparabronchialen Septen verlaufen. Die davon abgehenden *Arteriola intraprabronchiales* ziehen durch das Gasaustauschgewebe und enden an den Atrien in Kapillaren. Das oxygenierte Blut fließt aus den Blutkapillaren durch die intraprabronchialen Venolen in die interparabronchialen Venen in Richtung Herz zurück. Es existieren keine arteriovenösen Anastomosen (Maina 2005).

Die sekundären Bronchien werden durch Parabronchien bogenförmig verbunden, aus denen Atrien als Erweiterung und eigentliches Gasaustauschgewebe mit den sogenannten *Infundibula* und Luftkapillaren hervorgehen (siehe Abb. 4; Maina 2005). Die Parabronchien haben, je nach Vogelart einen Durchmesser von einem halben bis zwei Millimeter (Salomon 1993) und sind mit dem eigentlichen Austauschgewebe ummantelt. Die Dicke des Gasaustauschgewebes beträgt 200 bis 500 Mikrometer (Maina 2005). Hexagonal angeordnet, bilden sie besonders an der Lungenoberfläche in zahlreichen Anastomosen ein *Planum anastomoticum* (Salomon 1993). Das Epithel der Parabronchien und des sie umgebenden Gasaustauschgewebes ist ein einschichtiges Plattenepithel aus Typ I Pneumozyten (Maina 2005). Aus dem parabronchialen Lumen gehen die Atrien ringförmig durch weitere Einsenkung in das umgebende Mesenchym hervor. Die Atrien werden an ihrem Eingangsbereich jeweils von einem Netz aus glatter Muskulatur, *Musculi atriales* umgeben und grenzen sich durch interatriale Septen voneinander ab. Aus den Atrien gehen zwei bis acht (Maina 2005; Makanya et al. 2011b) trichterartige *Infundibula* ab und setzen sich schließlich in mehrere Luftkapillaren, den Orten des Gasaustausches fort. Die Luftkapillaren haben einen Durchmesser von nur drei bis zehn Mikrometer (maximal werden 20 Mikrometer erreicht). Sie bilden pro Volumeneinheit Lungengewebe eine Austauschfläche, die circa zehnmal größer ist als bei den Säugetieren. So beträgt zum Vergleich der kleinste Durchmesser einer Alveole bei den Säugern circa 35 Mikrometer (Starck 1982; Salomon 1993). Die Luftkapillaren werden auch als *Pneumocapillares* oder *Tubuli respiratorii* bezeichnet und anastomosieren untereinander, aber nicht mit Kapillaren der benachbarten Parabronchien. Sie verlaufen hauptsächlich zentrifugal zum parabronchialen Lumen und werden von Blutkapillaren ringförmig umwunden. Diese Blut- und Luftkapillaren machen etwa 90% des Volumens des Gasaustauschgewebes aus (Maina 2005; Makanya et al. 2011b).



**Abbildung 4:** Histologischer Querschnitt durch einen Parabronchus im adulten Vogel. Zentral liegt das luftleitende Lumen (Lu). Die Atrien (At) werden in ihren Eingängen von der atrialen Muskulatur (gM) umgeben. Sie geben die *Infundibula* (In) ab, welche in die Luftkapillaren im Gasaustauschgewebe (Gg) übergehen. In den interparabronchialen Septen verlaufen die interparabronchialen Arterien (Ai) und Venen (Vi). Abbildung modifiziert nach Kolb (1991).

Die granulären Typ II Pneumozyten sowie die Makrophagen kommen bei den Vögeln nur bis in die Atrien und die *Infundibula* vor. Im eigentlichen Gasaustauschgewebe fehlen sie (Maina 2005; Maina und West 2005). In der Vogellunge treten nur wenige freie Oberflächenmakrophagen auf, weil auch die Epithelzellen der Atrien und *Infundibula* phagozytieren können. Dagegen findet man subepithelial und intravaskulär viele Makrophagen (Maina 2002). Bei einigen Vogelgruppen, wie zum Beispiel den Hühnern, sind die Parabronchien mit ihrem Mantel an Austauschgewebe durch interparabronchiale Septen getrennt. Bei anderen Gruppen, man sagt bei guten Fliegern, fehlen diese Septen (Kolb 1991). Diese dünnen Bindegewebslamellen haben eine etwa hexagonale Form und beinhalten weiterhin die interparabronchialen Arterien und Venen (Salomon 1993; Maina 2005).

Die Blut-Gas-Barriere besteht auch bei Vögeln aus drei Anteilen: dem Endothel der Blutkapillare, der Basallamina und dem Epithel der Luftkapillare (Maina 2005). Sie ist jedoch wesentlich dünner als bei den Säugetieren. Beim Haushuhn ist sie nur etwa 0,32 Mikrometer stark, halb so viel wie bei einer erwachsenen Ratte (Makanya et al. 2013). Beim Menschen beträgt die Dicke der Blut-Gas-Barriere im Mittel 2,2 Mikrometer (Junqueira et al. 1996; Makanya et al. 2006). Im Gasaustauschgewebe der Vögel liegen die individuellen Basallaminae der Endothel- und der Epithelzellen direkt, ohne Zwischenraum aufeinander. Die Organellen der jeweiligen Zellen sind in die am Gasaustausch nicht beteiligten Ecken verlagert (Maina 2005). Die dünne Basallamina enthält Kollagen vom Typ IV und kollagene

Fasern. Elastische Fasern finden sich besonders in den interatrialen Septen und in der Nähe der atrialen Muskeln (de Lurdes Pinto et al. 2006; Jimoh und Maina 2012). Die extrem dünne Blut-Gas-Barriere ist aufgrund ihrer dichten wabenartigen Struktur sehr stabil. Die Blutkapillaren werden zusätzlich durch gespannte Epithelbrücken stabil gehalten (West et al 2006; West et al. 2010).

Das Epithel wird von einer Schicht aus Surfactant bedeckt, das die Oberflächenspannung herabsetzt und ein Kollabieren der dünnen Membranen verhindert. Nach Untersuchungen von Maina und Makanya setzt sich dieses aus zwei Komponenten zusammen, den osmiophilen lamellierten Körperchen und der dreischichtigen Substanz (*trilaminar substance*). Die lamellierten Körperchen kommen auch bei Säugern vor und werden bei den Vögeln durch granuläre Typ II Pneumozyten in den Atrien auf merokrinem Weg sezerniert (Maina 2005; Makanya et al. 2006). Die dreischichtige Substanz ist eine Besonderheit der Vögel und tritt in der Ontogenese später als die osmiophilen Körperchen auf. Sie ist beim erwachsenen Vogel hauptsächlich im Lumen der Parabronchien und den Atrien vorhanden und tritt in den Typ I Pneumozyten auf (Maina 2005; Maina und West 2005). Bis zu zwei Wochen nach dem Schlüpfen findet man sie auch in den Luftkapillaren. Sie hat ein niedrigeres Lipid zu Protein Verhältnis und verschwindet nicht während der Gewebepräparation (Maina 2006).

Alle Vögel besitzen diese oben beschriebene Lungenstruktur. Sie wird Palaeopulmo, *Pulmo arcuiformis*, genannt und als evolutionär älter betrachtet (Starck 1982; Nickel et al. 1992). Sie bildet sich hauptsächlich aus den die medioventralen und die mediodorsalen Bronchien verbindenden Parabronchien. In diesem Paleopulmo erfolgt der Luftstrom stets von kaudal nach kranial, beziehungsweise von den mediodorsalen zu den medioventralen Bronchien (Maina 2005). Die meisten Vogelgruppen haben zusätzlich einen Teil anders strukturierter Lunge, das Neopulmo. Er besteht aus einem Netz Parabronchien, das die hinteren Luftsäcke mit dem kaudalen primären Bronchus und den kaudalen sekundären Bronchien verbindet. Auf Grund seines dichten Netzwerkes von Parabronchien wird es auch *Pulmo reteformis* genannt (Starck 1982; Salomon 1993; Maina 2005). Hier erfolgt der Luftstrom kaudal während der Inspiration und kranial bei der Expiration (Maina 2005). Bei einigen Vogelgruppen, wie beispielsweise auch bei den Hühnern, kann sich das Neopulmo bis zu den kranialen Luftsackansätzen ausdehnen (Starck 1982). Im Allgemeinen liegt der Paleopulmo kraniodorsal, während das Neopulmo kaudovertral zu finden ist. Bei den Hühnern anastomosieren beide Lungenanteile. Die Parabronchien in den jeweiligen Anteilen unterscheiden sich im Hinblick auf ihren histologischen Aufbau jedoch nicht (Maina 2005).

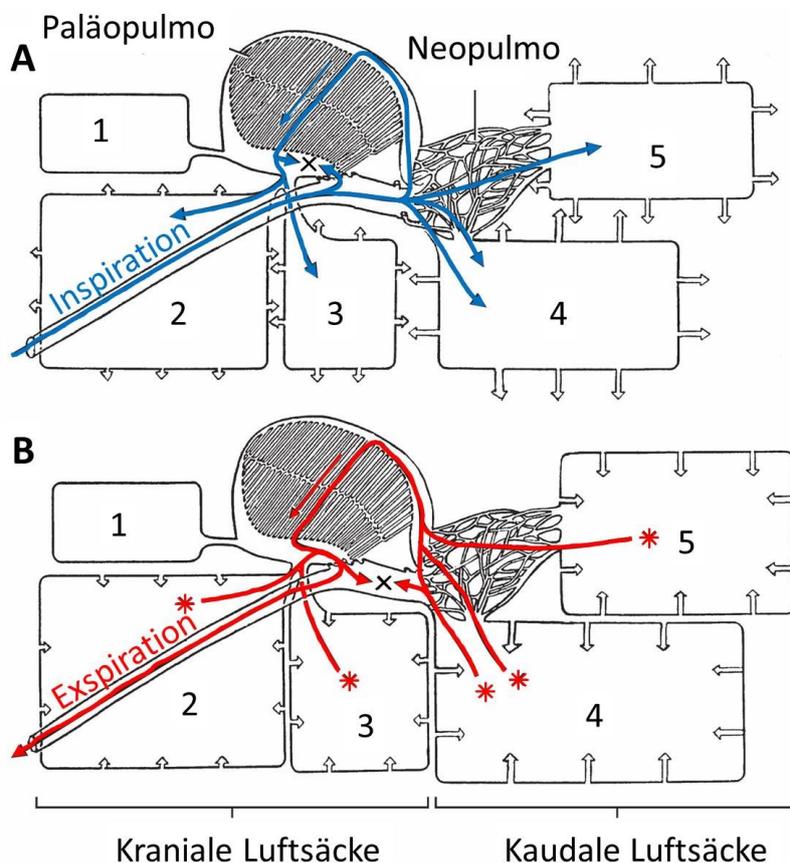
## 2.1.2 Die Luftsäcke und die Funktion der Lunge

Wie kurz erläutert, sind mehrere Luftsäcke, *Sacci pneumatici* mit der Lunge verbunden. Sie sind bis auf die beiden großen abdominalen Luftsäcke mit dem umgebenden Gewebe und Organen verwachsen und stehen in Kontakt mit den Hohlräumen in den Knochen, sowie den Bindegewebsräumen unter der Haut und um die Organe. Die Luftsäcke teilt man in die vorderen, kraniale und die hinteren, kaudale Luftsäcke ein. Die Gesamtzahl und Form der Luftsäcke ist sehr variabel zwischen den verschiedenen Vogelarten. Die kranialen Luftsäcke gehen von den Ventrobronchien ab und werden in die zervikalen, die klavikulären Luftsäcke und die präthorakalen oder kranialen Brustluftsäcke unterteilt. Die abdominalen Luftsäcke sind die größten und sind als einzige frei beweglich. Zusammen mit den postthorakalen oder kaudalen Brustluftsäcken bilden sie die Gruppe der kaudalen Luftsäcke. Die kaudalen Brustluftsäcke sind über die lateroventralen, laterodorsalen und mediodorsalen Bronchien mit dem Hauptbronchus verbunden (Starck 1982; Nickel et al. 1992; Salomon 1993; Maina 2005; Makanya und Djonov 2008; Westheide et al. 2010).

Der Übergang von Lunge zu Luftsack wird als Ostium bezeichnet. Dabei wird die Verbindung zu den Parabronchien als Typ I beziehungsweise indirektes Ostium und die Anheftung an die Bronchien als Typ II beziehungsweise direktes Ostium benannt (Salomon 1993; Maina 2005). Die kaudalen Luftsäcke sind zusätzlich über so genannte Saccobronchien mit den Parabronchien verbunden. Die Saccobronchien fassen trichterförmig mehrere Parabronchien zusammen und haben insgesamt einen größeren Durchmesser als die direkten Verbindungen zwischen hinteren Luftsäcken und Lunge (Salomon 1993). Zumeist haben die Luftsäcke sowohl direkte als auch indirekte Verbindungen zur Lunge (Maina 2005). Histologisch bestehen die Luftsäcke hauptsächlich aus einem einschichtigen flachen Epithel umgeben von einem dünnen Bindegewebe. Die Zellen des Luftsackepithels sind apikal mit Schlussleisten, *junctional complexes* und lateral durch Interkalationen verbunden. Luminal sind Mikrovilli vorhanden und im Zytoplasma lysosomenartige Granula. Es wurde von einigen spärlichen glatten Muskelzellen und Fettzellen in der Luftsackwand berichtet, ebenso von adrenergen und cholinergen Nervenplexi, jedoch sind keine Blutgefäße vorhanden. Die Ansätze der Luftsäcke hin zur Lunge besitzen ein zilientragendes hochprismatisches Zylinderepithel (Nickel et al. 1992; Salomon 1993; Maina 2005).

Stark vereinfacht ist die Funktionsweise der Atmung bei den Vögeln vergleichbar mit einem System von Blasebälgen, das Luft in immer gleicher Richtung durch die starren Röhren der Lunge bläst (siehe Abb. 5). Es wird angenommen, dass die Oberfläche der Luftsäcke keine Bedeutung für den eigentlichen Gasaustausch hat (Salomon 1993; Westheide et al. 2010). Bei

der Inspiration gelangt frische Luft durch die Trachea und die primären Bronchien in das Atmungssystem. Etwa die Hälfte eines Atemzugvolumens wird durch die Laterobronchien, das Neopulmo und die Saccobronchien in die kaudalen Luftsäcke gesaugt. Gleichzeitig dehnen sich die kranialen Luftsäcke und ziehen die verbrauchte Luft aus dem Röhrensystem der Lunge durch die Ventrobronchien. Dadurch fließt die zweite Hälfte der Luft von kaudal durch die Dorsobronchien in die Lunge, angesaugt durch die in die kranialen Luftsäcke abfließende Luft. Bei der Expiration wird die frische Luft aus den kaudalen Luftsäcken durch die Neoplumo und die Laterobronchien in die Lunge gepresst. Die in der Lunge befindliche Luft fließt durch die Hauptbronchien zusammen mit der verbrauchten Atemluft, die sich in den kranialen Luftsäcken befindet durch die Trachea ab. Die Luft aus den vorderen Luftsäcken strömt beim Verlassen durch die vorderen Ventrobronchien in die primären Bronchien und die Trachea. Eine „Portion Atemluft“ braucht somit zwei Züge um das Atmungsorgan des Vogels zu durchlaufen, wenn sie über die hintere Luftsackgruppe fließt (Starck 1982; Hildebrand et al. 2004; Westheide et al. 2010). Diese unidirektionale Luftströmung, sowohl in In- als auch in Expiration, gilt für den Paleopulmo. In der kaudal gelegenen Neopulmo wechselt der Luftstrom mit der Ein- und Ausatmung so wie in den großen Bronchien.



**Abbildung 5:**

Vereinfachtes Schema der Luftströmungen beim Atemvorgang der Vögel. (A) Einatmung, (B) Ausatmung. Es ist nur ein Teil der beim Haushuhn vorhandenen Luftsäcke dargestellt, die teilweise in Gruppen zusammengefasst wurden:

(1) Cervikaler Luftsack, (2) Interklavikulärer Luftsack, (3) vorderer thorakaler Luftsack, (4) hinterer thorakaler Luftsack, (5) abdominaler Luftsack, (x) Luftstau, (\*) Beginn der Luftbewegung in den Luftsäcken bei der Ausatmung.

Abbildung modifiziert nach Westheide und Kollegen (2010).

Über die Leitung des Luftstromes in die verschiedenen sekundären Bronchien und die Aufrechterhaltung des unidirektionalen Luftstromes im Paleopulmo existieren verschiedene Erklärungsmodelle und Theorien. Hildebrand und Kollegen (2004) und Westheide und Kollegen (2010) sprechen von inspiratorischen und expiratorischen aerodynamischen Klappen, die sogar in beatmeten toten Vögeln den unidirektionalen Luftstrom aufrechterhalten. Im primären Bronchus wurden auf Höhe des Eintrittes in die Lunge, bevor die ersten medioventralen sekundären Bronchien abgehen, Lumeneinengungen gefunden. Der beschleunigte Luftstrom an dieser Stelle soll die eingeatmete Luft an den medioventralen Bronchien vorbeiführen. Diese Einengung wurde deshalb *segmentum accelerans* genannt und ändert ihre Größe offenbar je nach respiratorischer Rate (Wang et al. 1992). Morphologisch findet sich eine aerodynamische hochvaskularisierte Struktur, die analog Schwellkörpern mit Blut gefüllt wird beziehungsweise abschwilt (Maina 2005). Das Paleopulmo wird praktisch immer mit Frischluft ventiliert. Auf diese Weise ist das bei der bidirektionalen Luftströmung in der Säugerlunge bestehende Problem des Totraumvolumens minimiert und es kann eine deutlich höhere Austauschkapazität als in der Lunge der Säugetiere erreicht werden, wie im Folgenden dargestellt wird.

Im Austauschgewebe erfolgt die Luft-Blut-Zirkulation im Kreuz- oder Querstromprinzip. Das Blut in den intraparábrónchialen Arterien fließt, vereinfacht gesehen, im rechten Winkel zur Luft im parábrónchialen Lumen. Kaudal ist die Luft in den Parábrónchien sauerstoffreich und kohlendioxidarm, umgekehrt ist das Verhältnis am kranialen Ende der Parábrónchien. Das Blut der pulmonalen Arterien nimmt im Gasaustauschgewebe der Parábrónchien verschiedene Mengen an Sauerstoff auf, beziehungsweise gibt Kohlendioxid ab. Es fließt erst zentripetal in Richtung des parábrónchialen Lumens und dann wieder zentrifugal in die interparábrónchialen Venen. So erfolgt die Arterialisierung des Blutes in einem in Serie geschalteten multikapillären System (*multicapillary serial arterialization system*), in dem die zum Gasaustausch verfügbare Zeit verlängert ist (Maina 2002; Maina 2005). Weiterführende Untersuchungen von Makanya zeigen zudem wie die Blutkapillaren ringförmig um die Luftkapillaren herum aufgebaut sind und daher Blut- und Luftstrom orthogonal zueinander in einem weiteren Querstromsystem fließen (Makanya und Djonov 2009; Makanya et al. 2011b). Somit kann der Sauerstoffpartialdruck des angereicherten Blutes höher sein als in der ausgeatmeten Luft, beziehungsweise der Kohlendioxidpartialdruck in der ausgeatmeten Luft höher sein als im arteriellen Blut (Maina 2002; Maina 2005; Westheide et al. 2010).

Der Gasaustausch im Kreuzstromprinzip ist unabhängig von der Richtung der Luftbewegung in den Parábrónchien und erfolgt somit in annähernd gleicher Effizienz im Paleo- wie im

Neopulmo (Maina 2002; Maina 2005). Neben diesem Kreuzstromprinzip der großen Luft- und Blutströme existiert ein kleineres Gegenstromprinzip im Gasaustauschgewebe um das parabronchiale Lumen. Sauerstoffreiche Luft diffundiert zentrifugal aus dem parabronchialen Lumen, während sauerstoffarmes Blut zentripetal in den intraprabronchialen Arteriolen fließt. Umgekehrt verhält es sich mit dem Kohlendioxid. Die Bedeutung und der Beitrag dieses Systems werden in Betrachtung des stark vernetzten Systems der Blut- und der Luftkapillaren als eher gering betrachtet (Maina 2005). Im Vergleich zu Säugern hat die Vogellunge nicht nur eine zehnmal größere Austauschfläche pro Volumeneinheit Lunge, sondern enthält auch mehr Blutvolumen (Hildebrand et al. 2004). Durch diese größere Fläche und die dünnere Luft-Blut-Schranke erreichen Vögel eine vier- bis fünfmal höhere Diffusionskapazität als Säugetiere (Westheide et al. 2010). Durch die geringen Durchmesser der Luftkapillaren in der Vogellunge ist die Oberflächenspannung höher als bei den Säugern. Ein Kollabieren dieser kleinen Räume kann nur durch eine volumenkonstante Lunge verhindert werden (Salomon 1993). Interessanterweise wird berichtet, dass selbst Kompression die Vogellunge nicht einfach zum Kollabieren bringt. Eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung dieser erstaunlichen Stabilität soll die oben beschriebene dreischichtige Substanz haben (Maina 2005).

## 2.2 Die embryonale Entwicklung des Atemorgansystems

Im Folgenden wird die Entwicklung des Atemorgansystems des Vogels am Beispiel des Haushuhnes erklärt. Auf dieses Beispiel beziehen sich die Angaben des Entwicklungsstadiums bezüglich der einzelnen Bebrütungstage.

### 2.2.1 Die embryonale Entwicklung der Vögel

Auf die allgemeine embryonale Entwicklung der Vögel soll hier nur kurz eingegangen und der Schwerpunkt auf die Entwicklung der Lunge gelegt werden. Der wohl auffälligste Unterschied zwischen Säugetieren und Vögeln ist die Entwicklung der Nachkommen außerhalb des Körpers der Elterntiere. Ein Vogelei enthält alle notwendigen Nährstoffe und Faktoren, die zur weiteren Entwicklung benötigt werden. Das Vogelei ist dotterreich, telolecithal im Gegensatz zu den dotterarmen, oligolecithalen Eiern der Säuger. Der Dotter wird von der Vitellinmembran umschlossen und mit den Hagelschnüren im Ei befestigt. Des Weiteren charakterisiert ein Vogelei unter anderem das Albumen, umgangssprachlich „Eiklar“ genannt, und die verkalkte Schale mit der innen liegenden Pergamenthaut (Hassel 2006). Durch den Dotterreichtum erfolgt die Furchungsteilung der Zygote partiell, meroblastisch am animalen Pol und nicht total, holoblastisch wie bei den Säugern. Es entsteht ein discoidales zelluläres Blastoderm, die Keimscheibe. Das Blastoderm differenziert sich in zwei Zelllagen, den Epiblasten und den darunter liegenden Hypoblasten (Hildebrand et al. 2004; Wolpert 2011). Während der Gastrulation bildet sich auf der Keimscheibe im posterioren Bereich ein Primitivstreifen aus. Durch diesen treten im Zuge der Gastrulation Zellen in den Hypoblasten ein und verdrängen die Hypoblastenzellen an den Rand der Keimscheibe. Diese einwandernden Zellen bilden erst das Entoderm und später das Mesoderm. Sie wandern auch nach anterior und formieren sich zur *Chorda dorsalis*. Das Mesoderm bildet posterior und lateral die Somiten, die Seitenplatten und das extraembryonale Mesoderm. Das Coelom bildet sich durch Aushöhlung der Somiten und des anschließenden Mesoderms. Aus dem Epiblasten geht in der weiteren Folge das Ektoderm hervor. Das Mesoderm gliedert sich in das somatopleurale Mesoderm, angelagert an das Ektoderm, und das splanchnopleurale Mesoderm, angelagert an das Entoderm (Hildebrand et al. 2004; Hassel 2006; Wolpert 2011). Das Entoderm entwickelt sich weiter zur Auskleidung des Darmrohres. Es zieht sich röhrenförmig aus, durchbricht kranial und kaudal das Ektoderm und bildet somit die Schlundöffnung und die Kloake. Von der Mitte des Darmrohrs geht es kontinuierlich über den Dotterstiel in den großen Dottersack über. Die Allantois wächst als Aussackung aus dem

hinteren Darmabschnitt in die extraembryonale Coelomhöhle ein. Sie lagert sich mit dem Chorion zusammen und gemeinsam dient diese vaskularisierte Membran (Chorioallantois) dem Gasaustausch, der Aufnahme des Albumen und der Mineralien aus der Eischale (Hildebrand et al. 2004; Wolpert 2011). Die embryonalen Entwicklungsstadien des Haushuhns werden nach Hamburger und Hamilton (1951, reprint 1992) eingeteilt. Nach circa sechs Tagen Bebrütung ist das Stadium 29, nach circa acht Tagen Stadium 34, nach zehn Tagen Stadium 36, nach 12 Tagen Stadium 38, nach 14 Tagen Stadium 40, nach 16 Tagen Stadium 42 erreicht. Im Stadium 46 nach 20 bis 21 Bebrütungstagen schlüpfen die Küken (Hamburger und Hamilton 1992).

### **2.2.2 Die Entwicklung der Lunge und der Luftsäcke**

Das Atemorgansystem der Vögel entwickelt sich wie bei den Säugern aus dem Vorderdarm. Am Entwicklungstag drei (E3) der Embryogenese (Stadium 26 nach Hamburger und Hamilton) buchtet sich das Entoderm beidseitig lateral in das Mesoderm vor. Diese beiden Ausstülpungen wandern nach ventral in die Mitte und fusionieren bis zum Tag vier. Sie teilen sich anschließend in die rechte und linke Lungenknospe. Diese beiden Lungenknospen, bestehend aus dem entodermalen Epithel und dem umhüllenden Mesenchym, wachsen durch die Coelomhöhle in Richtung der lateralen Wand des Embryos. Sie erreichen ihre endgültige laterodorsale Position am Tag acht, nähern sich den Rippen und beginnen mit diesen zu verwachsen. Am Ende des 9. Tages sind sie dorsal bereits mit den Rippen verwachsen und der Hilus liegt kraniomedial der Lunge (Maina 2003a; Maina 2005). Aus der Trachea entwickelt sich als erstes der primäre Bronchus. Er wächst vom Hilus bis zum kaudalen Ende der Lunge. Am fünften Entwicklungstag entspringen die ersten sekundären Bronchien aus ihm (Sakiyama et al. 2000; Moura et al. 2011). Ab Entwicklungsstadium E8 gehen schließlich die ersten Parabronchien aus den sekundären Bronchien hervor (Sakiyama et al. 2000). Die Parabronchien wachsen aufeinander zu und verbinden sich und damit auch die sekundären Bronchien untereinander (Starck 1982). Sie wachsen als epitheliale Stränge, die erst sekundär ein Lumen erhalten, ins umgebende Mesenchym ein (Maina 2005). Das Mesenchym der embryonalen Lunge ist ventral in der Nähe des Hilus und im Bereich der Luftsackansätze lockerer und zellärmer als dorsal im Bereich der wachsenden Parabronchien aufgebaut (Miura et al. 2009).

Die Parabronchien sprossen in regulären Abständen aus den sekundären Bronchien (Maina 2006). Insgesamt folgt das Wachstum der Bronchien einem monopodialen Muster und wird durch verschiedene molekulare Faktoren gesteuert (Gleghorn et al. 2012). Hierbei wird die

Aussprossung der sekundären Bronchien und Parabronchien durch apikale Konstriktion des Epithels gefördert (Kim et al. 2013). Die Parabronchien anastomosieren ab dem Stadium E12 (Makanya et al. 2006). Makanya und Djonov (2008) beobachten diesen Vorgang im Stadium E17 indem die Parabronchien dünne Fortsätze zu den gegenüberliegenden Parabronchien senden. Über diese Entwicklungsprozesse liegen insgesamt noch wenige Informationen vor. Eine Kombination aus morphologischen und funktionellen Untersuchungen lässt sich nur punktuell in der Literatur finden. Am Tag 14 sind beim Huhn sowohl im Neopulmo als auch im Paleopulmo die Parabronchien ausgeformt und haben großenteils anastomosiert. Die Parabronchien des Paleopulmo liegen in parallelen Bögen dorsal des primären Bronchus, während die Parabronchien des Neopulmo ventral des Hauptbronchus stärker anastomosieren (Maina 2005). In der letzten Entwicklungswoche vor dem Schlupf erfolgt eine starke Umwandlung des Mesenchyms durch extensive Apoptose, nach Makanya und Kollegen (2006) im Zeitraum von E14 bis E18, abweichende Angaben finden sich bei Maina (E19 bis E21; Maina 2005). Bereits vor dem Schlupf wird die Lunge etwa ab dem Entwicklungsstadium E18 ventiliert und ist beim Schlupf vollständig entwickelt (Maina 2005; Makanya et al. 2011a). Es existieren geringe Unterschiede in der Lungenentwicklung zwischen Nestflüchtern, zum Beispiel beim Huhn, und Nesthockern. Während bei Nestflüchtern die Lunge nach dem Schlupf nur noch in der Größe wächst, ist ihre Entwicklung bei Nesthockern erst kurz vor dem Flüge sein abgeschlossen (Maina 2005).

Die Luftsäcke erscheinen zuerst als kleine bläschenartige Ausstülpungen an der kranialen, ventralen und kaudalen Lungenoberfläche. Nach etwa fünf Tagen Bebrütung ist als erstes die Anlage der großen abdominalen Luftsäcke am distalen Ende der Lunge sichtbar. Ab dem siebenten Entwicklungstag erscheint auch der zervikale Luftsack als Ausstülpung auf der kranialen Lungenseite. In Folge treten zwischen den Entwicklungsstadien E7 und E12 die klavikulären Luftsäcke auf der kranialen Seite und die kraniothorakalen und die kaudothorakalen Luftsäcke auf der ventralen Seite hervor. Der abdominale Luftsack durchbricht das horizontale Septum und dringt in die Bauchhöhle ein (Sakiyama et al. 2000; Maina 2005). Die anderen Luftsäcke wachsen in die umgebenden bindegewebigen Septen ein (Starck 1982; Hempel 2018).

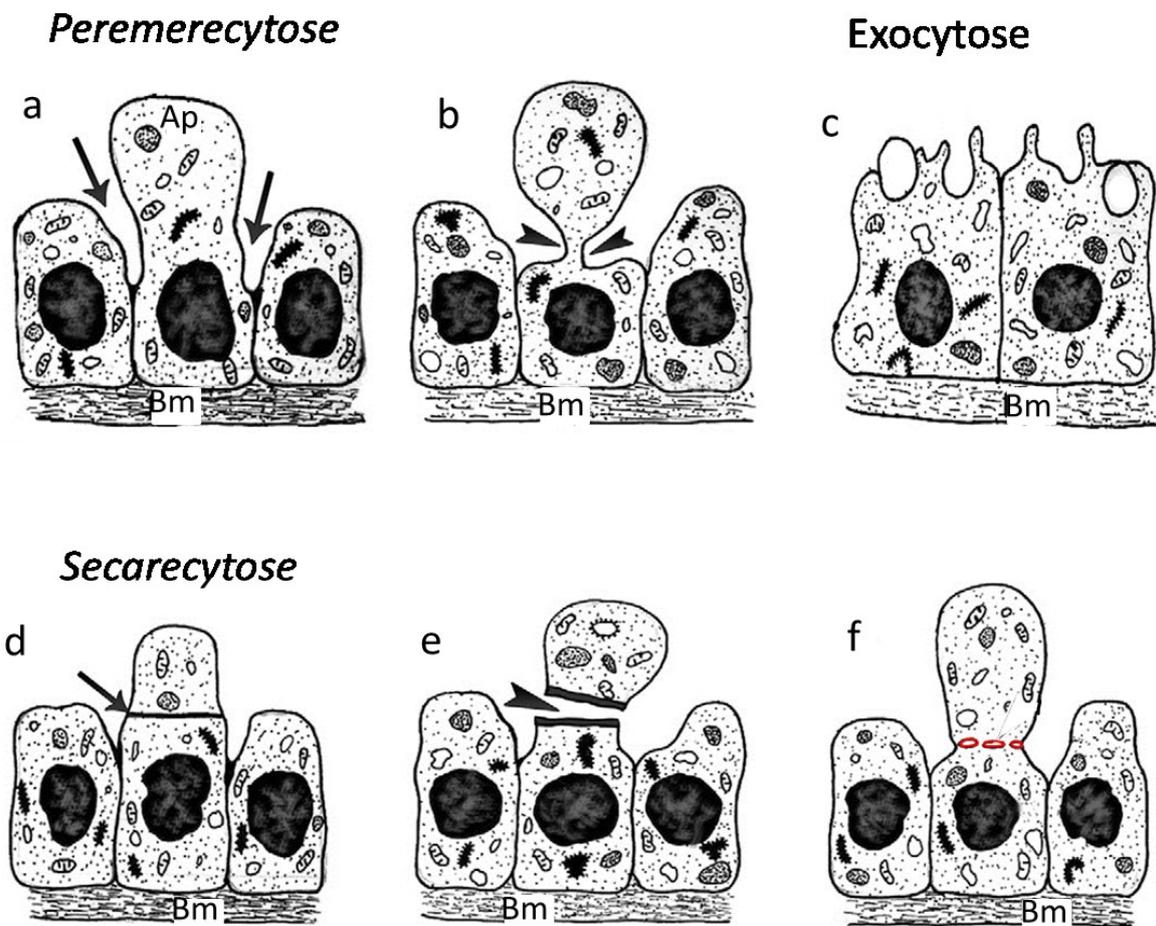
Aus den scheinbar homogenen mesenchymalen Zellen der embryonalen Lunge bilden sich ab Tag fünf hämatogene Zellen heraus. Diese differenzieren sich weiter in Erythroblasten und Leukoblasten und scheinen zunächst nicht von Angioblasten umgeben zu sein. Eine diffuse Vaskulogenese ist ab dem Stadium E7 dort erkennbar, wo im Mesenchym viele Erythrozyten verstreut liegen. Die Erythrozyten induzieren die Differenzierung angrenzender

Mesenchymzellen in angiogene Zellen. Diese formieren sich um die Erythrozyten und bilden schließlich endotheliale Zellen und Gefäßwandzellen. Ab dem Entwicklungsstadium E9 beginnen die anfangs noch vereinzelt Gefäßinseln zu anastomosieren und umwachsen die sich entwickelnden Parabronchien. So sind zum Stadium E11 die interparabronchialen Gefäße gut sichtbar, denn sie sind mittig zwischen den Parabronchien lokalisiert (Maina 2005). Die starke Aussprossung und Verzweigung von Blutkapillaren hat ihren Höhepunkt im Stadium E15 erreicht, dann wird das Blutgefäßnetz überwiegend durch Aufsplitten und Verzweigung bestehender Gefäße (*intussusceptive angiogenesis*) weiter ausgebaut (Makanya et al. 2007; Makanya und Djonov 2009). Erst nach Tag 18 beginnt die vollständige Blutzirkulation durch die zu diesem Zeitpunkt gut ausgebildeten Blutkapillaren, die Anschluss an die zentralen arteriellen und venösen Gefäße gewonnen haben (Maina 2005; Anderson-Berry et al. 2005; Makanya et al. 2011a).

### 2.2.3 Die Entwicklung des Epithels und des Gasaustauschgewebes

Zum Zeitpunkt E8 ist das Epithel der Bronchien zunächst kubisch, wird bis E10 hochprismatisch und schließlich ab dem Stadium E12 pseudostratifiziert hochprismatisch, bevor es bis auf das schmale Epithel der Blut-Gas-Schranke abflacht. Im Gegensatz zum Mesenchym sind im Epithel keine apoptotischen Vorgänge zu beobachten. Insgesamt gesehen wird das initial kubische bis hochprismatische Epithel durch die Vorgänge der Secarecytose (*secarecytosis*) und Peremerecytose (*peremerecytosis*) allmählich in flaches Epithel verwandelt (siehe Abb. 6). Die Prozesse ähneln der apokrinen Sekretion in Drüsen, da die abgetrennten Zellteile auch Organellen enthalten und sich im parabronchialen Lumen mittels eines degenerativen Prozesses (*vacuolar degeneration*) auflösen (Makanya et al. 2006). Bei der Peremerecytose werden apikal Aposomen von der Zelle abgeschnürt und treten als Zellteile im parabronchialen Lumen auf. Diese Trennung erfolgt durch eine Verschiebung der *Tight junctions* nach basal mit folgender apikaler Verbreiterung der Zwischenzellräume und Abschnürung des apikalen Zellanteils. Teilweise erscheint es, als ob dieser Teil oder gar eine ganze Zelle von den benachbarten Zellen aus dem Zellverband herausgeschoben werden. Wie ein Abschneiden der apikalen Aposomen erscheint die Secarecytose. Auch hier treten die apikalen Zellkontakte tiefer und die Zellzwischenräume verbreitern sich. Dann bildet sich eine Doppelmembran zwischen zurückbleibendem Zelleib und dem Aposom, die anschließend aufgetrennt wird. Ebenso trägt die Bildung von Vesikeln und Vakuolen zur Abflachung des Epithels bei. Die Vakuolen vereinigen sich in einer parallelen Reihe untereinander und mit der lateralen Zellmembran und führen so zur Abtrennung der apikalen

Zellbereiche. Apikale Exozytose von Vesikeln und Vakuolen soll die ab dem Entwicklungsstadium E12 transient auftretenden Einfaltungen und Fortsätze der Epithelmembran verursachen. Schließlich werden ab E15 die epithelialen Zellen zwischen den Atrien in ihrem Erscheinungsbild glatter und homogener. Die ins Lumen abgegebenen Zellteile werden durch pulmonale Makrophagen bereinigt. So ist beim Schlüpfen das Epithel flach, glatt und dünn (Makanya et al. 2006; Makanya et al. 2011a).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Umwandlungsprozesse des Epithels des Gasaustauschgewebes. Basallamina (Bm).

Peremerecytose: (a) basale Verschiebung der apikalen Zellkontakte (Pfeile), und Herausbildung eines Aposomes (Ap). (b) Abschnürung des Aposomes (Pfeilköpfe).

Exocytose: (c) Vesikel öffnen sich apikal ins Lumen, welche Mikrovilli und Einsenkungen der apikalen Membran hervorrufen.

Secarecytose: (d und e) Bildung einer Doppelmembran zum Aposom (Pfeil) und Auftrennung dieser (Pfeilkopf). (f) Abtrennung des Aposomes durch konfluierende Vesikel (rot markiert).

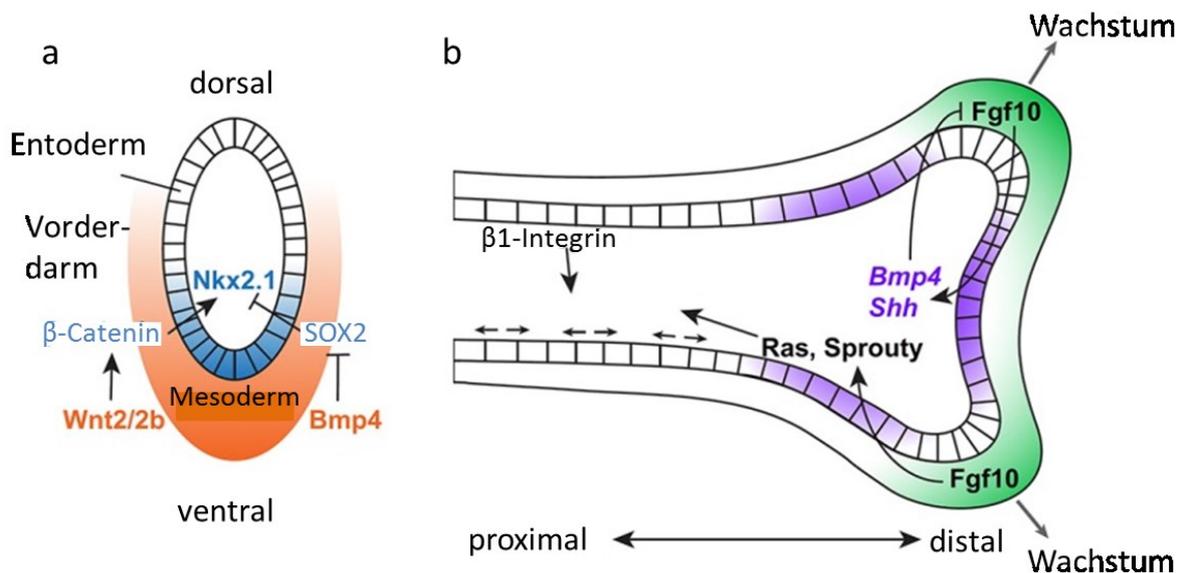
Abbildung modifiziert nach Makanya und Kollegen (2011a).

Das zunächst hochprismatische Epithel der Parabronchien flacht sich im Laufe der Embryogenese immer weiter ab. Mesenchymale Zellen legen sich kontinuierlich an die Basalmembran der Bronchien an. Ab dem Entwicklungsstadium E11 entstehen Lücken durch epitheliale Einsenkungen in diesem dichten „Mesenchymmantel“ (Makanya et al. 2006). Ab dem Stadium E13 werden erste Anzeichen der Atrienbildung sichtbar, durch luminale Epitheleinsenkungen und basalseitige Vorwölbung in das umgebende Mesenchym (Makanya et al. 2011a). Das Epithel der Parabronchien wächst auf diese Weise als Stränge in das umgebende Mesenchym ein und formt die Atrien am Tag 15, die *Infundibula* am Tag 16 und die Luftkapillaren am Tag 18. Ab dem Stadium E19 verzweigen sich die Luftkapillaren und beginnen zu anastomosieren. Die das parabronchiale Lumen auskleidenden epithelialen Zellen haben große interzelluläre Hohlräume und wölben sich prominent in das Lumen vor (Maina 2005; Makanya et al. 2011b). Ab Tag 17 sind die granulären Typ II Pneumozyten sichtbar, die durch *lamellar bodies* im apikalen Bereich charakterisiert sind (Makanya et al. 2006; Maina 2003b). Ab Tag 18 wachsen die Luftkapillaren stark in das umgebende Gewebe ein. Sie nähern sich den Blutkapillaren und vernetzen sich mit diesen zum Gasaustauschgewebe. Interstitielle Zellen zwischen Endothel und Epithel werden verdrängt oder durch Apoptose eliminiert (Maina 2005). Diejenigen mesenchymalen Zellen, die eingangs der Atrien der Basalmembran anliegen, entwickeln sich zu den glatten Muskelzellen, aus denen die spätere atriale Muskulatur hervorgeht (Makanya et al. 2011a). Nur in der frühen embryonalen Entwicklung sind zahlreiche freie Mesenchymzellen mit langen Filopodien und großen zentralen Zellkernen vorhanden (Maina 2003b).

#### **2.2.4 Die Steuerung der embryonalen Lungenentwicklung**

Die bei der Lungenentwicklung der Säugetiere mitwirkenden Faktoren und Signalwege sind insgesamt schon gut untersucht (Metzger et al. 2008). Man nimmt an, dass die grundlegenden Mechanismen der Differenzierung der Lungenanlagen bei den Vögeln ähnlich wie beim Säuger ablaufen, jedoch auf vogelspezifische Weise abgeändert worden sind, um die veränderten Bauprinzipien molekular umzusetzen. Verantwortlich für die Differenzierung und Verzweigung des Epithels sind Signalmoleküle aus dem umgebenden Mesenchym, Transkriptionsfaktoren, sowie extrazelluläre Matrixmoleküle und ihre Rezeptoren (Miura et al. 2009). Insbesondere das FGF-10 – Tbx4 – System ist in die frühe Bildung der Lungenknospe vom Vorderdarm involviert (Maina 2005). Tbx4, aus der Familie der T-Box Transkriptionsfaktoren, tritt im viszeralem Mesoderm der Lungenknospe bereits ab Entwicklungsstadium 15 nach Hamburger und Hamilton auf (Bebrütungszeit 50 bis 55

Stunden). Es aktiviert die Expression von FGF-10, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 10, im Mesoderm und beeinflusst die Expression von Nkx2.1, welches einen Homeobox Transkriptionsfaktor kodiert, im Entoderm (Sakiyama 2003; siehe Abb. 7).



**Abbildung 7:** Schema einiger Signaltransduktionswege der frühen Lungenentwicklung bei der Maus.

(a) Querschnitt durch den Vorderdarm in Höhe der sich bildenden Lungenknospe beim Mausembryo im Stadium E9. Das zukünftige Lungenepithel (blau markiert) exprimiert Nkx2.1 und grenzt sich so vom Entoderm (weiß markiert) ab. Aus dem umgebenden Mesoderm (orange markiert) fördern Wnt2 und Wnt2b Signale mittels  $\beta$ -Catenin die Bildung von Nkx2.1. SOX2 hemmt die Expression von Nkx2.1, wird aber wiederum selbst von Bmp4 aus dem Mesoderm gehemmt.

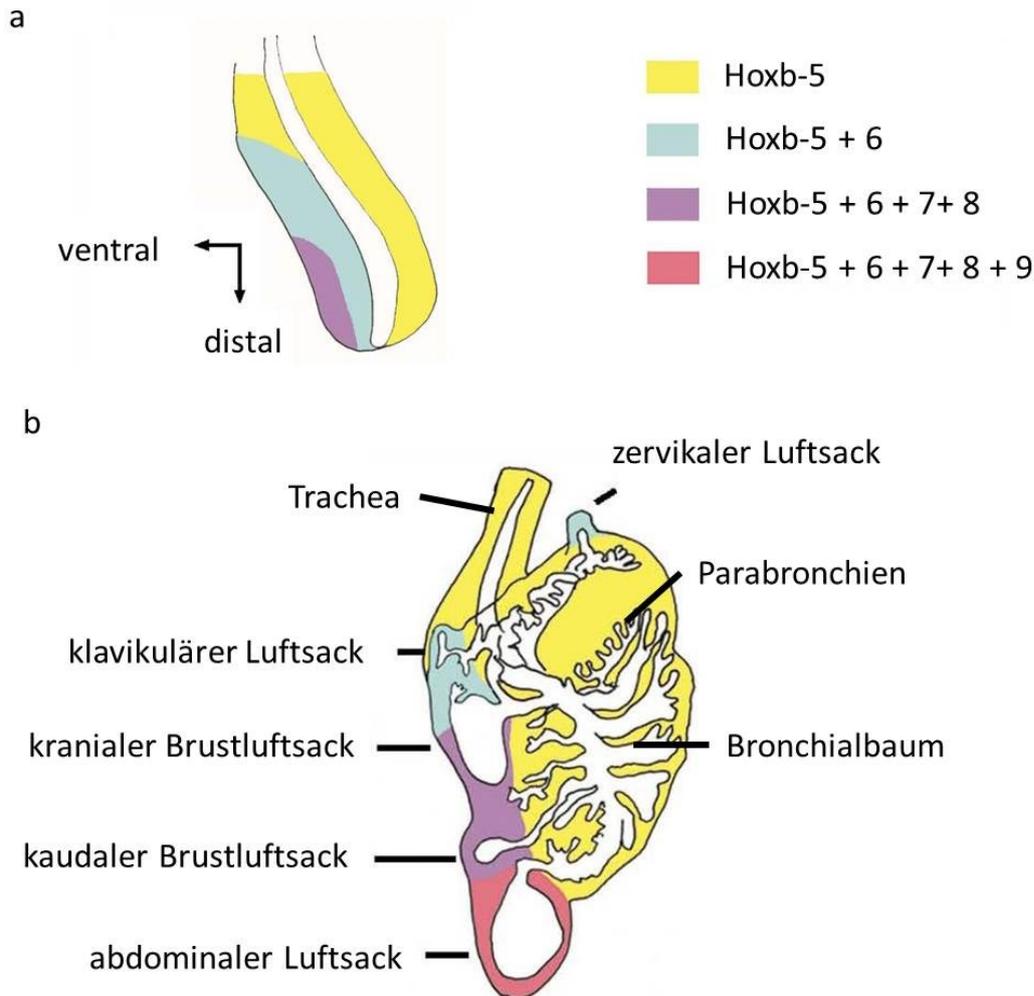
(b) Längsschnitt durch eine sich aufzweigende Bronchusknospe während der Stadien E12,5 bis E16,5 der Maus. FGF-10 (grün markiert) wird im die Bronchusknospen umgebenden Mesenchym gefunden. Im bronchialen Epithel wird außerhalb der Knospen Bmp4 und Shh (violett markiert) exprimiert, diese Faktoren hemmen die FGF-10 Expression. Über die Faktoren Ras und Sprouty reguliert FGF-10 die Zellteilung und somit das gerichtete Wachstum des Bronchus. Fibronectin vermittelt über  $\beta$ 1-Integrin ebenfalls das gerichtete Wachstum der Bronchien in der Säugurlunge.

Abbildung modifiziert nach Herriges und Morrisey (2014).

Fibroblasten Wachstumsfaktoren (Fibroblast Growth Factor, FGF) und seine Rezeptoren (FGFR) treten in der sich entwickelnden Lunge auf und vermitteln die Mesenchym-Epithel-Interaktion, die zu dem typischen Wachstumsmuster des Epithels führt (Makanya et al 2013).

Nach vier bis sechs Tagen Bebrütung tritt in der frühen Lungenentwicklung des Hühnerembryos FGF-10 im distalen, die epithelialen Spitzen der Hauptbronchien umgebenden Mesenchym auf (Moura et al. 2011). Es findet sich ebenso zwischen E5 und E9 im die Lungenknospen umgebenden Mesenchym (Miura et al. 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorangegangenen In-vitro-Experimenten mit Organkulturen zeigen, dass das Epithel von embryonalen Hühnerlungen des Entwicklungsstadiums E5 und E5,5 auf mit FGF-10 getränkte Agarose-Beads zuwächst und ebenso der Notch-Signalweg bei der Frühentwicklung der Hühnerlunge in diesen Stadien eine bedeutende Rolle spielt (Bertemes 2012). Die zentrale Rolle des FGF10 Signalwegs bei der Lungenentwicklung zeigt sich auch durch die unterschiedliche Verteilung der FGF-Rezeptoren FGFR-1 bis -4, in den sich entwickelnden Abschnitten und Geweben der Hühnerlunge während der Entwicklungsstadien E4 bis E6 (Moura et al. 2011). Die Aktivität des FGF-Signals im Epithelgewebe wird durch ein komplexes Wechselspiel mit weiteren Signalmolekülen, wie dem bone morphogenic protein (BMP) und dem Faktor sonic hedgehog (Shh), sowie manchen FGF10-Zielgenen wie Sprouty und Ras bestimmt. Die meisten dieser Wechselwirkungen werden durch negative Rückkopplung erreicht, die für eine lokale Begrenzung der FGF10 Expression sorgen und damit letztlich eine gerichtete Verzweigung der Lungenknospen beim Säuger sicherstellen. Zusätzlich spielen der Wnt-Signalweg und der Retinsäure-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Morphogenese und Verzweigung der Lungen (Herriges und Morrisey 2014; Swarr und Morrisey 2015). Die Verhältnisse beim Haushuhn und der genaue Einfluß der genannten Faktoren auf die monopodiale Verzweigung der Lunge sind beim Huhn insgesamt noch weniger gut verstanden. Verschiedene neuere Arbeiten konnten den Einfluß von Wnt, BMP, Shh und Retinsäure vermittelten Signalen auf die Expression von entsprechenden Zielgenen und teilweise auch auf die Morphogenese der Lunge zeigen (Loscertales et al. 2008; Moura et al. 2011; Moura et al. 2014; Moura et al. 2016; Fernandes-Silvia et al. 2017).

Die Regionalisierung und Spezifizierung der Lungenanlage und der damit verbundenen Luftsäcke wird durch Homeobox-B-Gene gesteuert. So zeigen die Gene Hoxb 5 bis 8 bereits im Entwicklungsstadium E4 verschachtelte Ausprägungen, die die kranio-dorsalen beziehungsweise ventro-kaudalen Achsen markieren. In späteren Entwicklungsstadien etwa zu E8 markiert die jeweilige Expression dieser Gene dann die verschiedenen morphologischen Bereiche der Lunge und Luftsäcke. Außerdem kommt Hoxb-9 im Bereich des abdominalen Luftsackes dazu (Sakiyama et al. 2000; siehe Abb. 8).



**Abbildung 8 (Seite 21):** Schematische Darstellung der Expression von Hoxb-Genen in der embryonalen Lungenentwicklung der Hühner.

(a) Ineinander verschachtelte Expression der Hoxb-Genen 5 bis 8 bei einer Lunge des Entwicklungsstadiums E4.

(b) Bei der Lunge im Stadium E8 entspricht die Expression der Hoxb-Gene der Morphologie. Die Trachea und die Bronchien exprimieren nur Hoxb-5. Der cervikale und klavikuläre Luftsack exprimieren Hoxb-5 und -6, der kraniale und kaudale thorakale Luftsack Hoxb-5, -6, -7 und -8. Hoxb-5 bis 9 exprimiert der abdominale Luftsack.

Abbildung modifiziert nach Sakiyama und Kollegen (2000)

Das Expressionsmuster der Hoxb-Gene lässt vermuten, dass die Ausbildung der funktionellen Einheiten in der Hühnerlunge, beispielsweise der Luftsäcke und unterschiedlichen Lungenabschnitte, ganz wesentlich von diesen Genen beeinflusst wird. Dies könnte durch die Steuerung der oben genannten Signalwege durch nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren erfolgen, die dann die weitere Bildung der spezifischen epithelialen-mesenchymalen Strukturen steuern. Beispielsweise können unter anderem BMPs und Wnt-Proteine als Zielfaktoren der Hox-Gene im Huhn gelten (Sakiyama et al. 2000). Im Huhn wurde ferner gezeigt, dass Wnt5a, ein Protein des Wnt5a-Genes, eine Rolle in der weiteren Differenzierung und Koordination der distalen Blut- und Luftkapillaren spielt. Es steuert in der vaskulären Strukturbildung des Mesenchyms Differenzierungssignale, die durch Fibronectin und VEGF (vascular endothelial growth factor) vermittelt werden. Im Epithel reguliert Wnt5a außerdem die Expression von E-Cadherin/L-CAM und  $\beta$ -Catenin (Loscertales et al. 2008). Auch der Transkriptionsfaktor SOX2, der eine bedeutende Rolle in der Lungenentwicklung der Säuger und Vögel hat, wird vermutlich durch die Aktivität von Homeobox-Genen reguliert (Ishii et al. 1998). Auf seine Expression und Funktion in der Lungenentwicklung wird im Abschnitt 2.3.2. S.26 f. näher eingegangen.

## 2.3 Die Marker und ihre Strukturen

In diesem Kapitel sollen die von den Antikörpern markierten Zellbereiche kurz dargestellt und die verwendeten Marker für die funktionellen ultrastrukturellen Untersuchungen vorgestellt werden.

### 2.3.1 Die Zellkontakte und das E-Cadherin

Zellkontakte sind interzelluläre Verbindungen durch Adhäsionsproteine. Zu den interzellulären Verbindungen gehören *Zonula occludens* (*Tight junctions*), *Zonula adhaerens* (*Intermediate junction*), Desmosomen (*Maculae adhaerentes*) und Nexus (*Gap junction*). Diese Zellkontakte treten charakteristischerweise in Epithelgeweben auf (Junqueira et al. 1996).

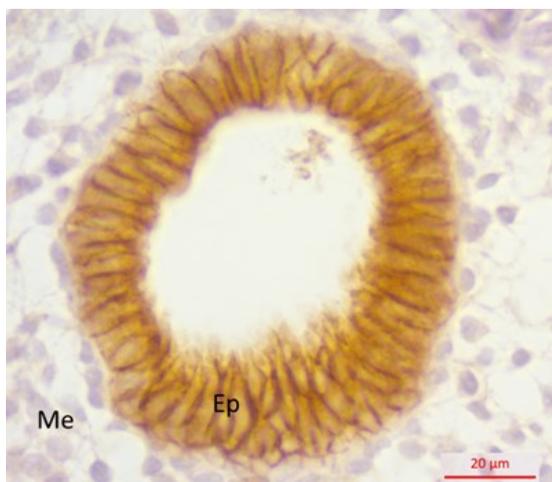
Für Desmosomen sind folgende Strukturen charakteristisch: transzellulär über Adhäsionsdomänen verbundene Transmembranproteine, die desmosomalen Cadherine, die über intrazelluläre Haftplatten an intermediäre Filamente der Zelle binden. *Maculae adhaerentes* haben einen Durchmesser von 0,3 bis 0,5 Mikrometer und Haftplatten von etwa 15 Nanometer Dicke. Der Interzellularspalt ist mit 25 bis 35 Nanometer deutlich breiter als an Stellen ohne Zellkontakt. Die interzelluläre Verbindung wird in diesem Spalt durch die Bindung der herausragenden Cadherinectodomänen als elektronendichter Streifen, *Mesophragma* genannt, sichtbar. Verschiedene Mitglieder der Cadherinfamilie, insbesondere Typ I Cadherine (klassische Cadherine), sind die maßgeblichen Adhäsionsmoleküle in den *Zonulae adhaerentes*, die die Zellen gürtelförmig umgeben. Ihr Zwischenzellraum enthält weniger dichtes Material und ist mit 15 bis 20 Nanometer Abstand etwas schmaler. Die intrazellulären Haftplatten sind hier über weitere Proteinkomplexe, die Catenine, an zytoplasmatische Aktinfilamente gebunden. Punktförmige Zell-Zellverbindungen, *Puncta adhaerentes*, sind unter Beteiligung des Cadherin/Catenin-Komplexes ähnlich aufgebaut, aber durch deutlich kleinere Kontaktflächen und weniger intensive Anbindung an das Zytoskelett als transiente Verbindungen gekennzeichnet (Junqueira et al. 1996; Kühnel 2002). Ein Verschmelzen der äußeren Zellmembranschicht ist charakteristisch für die *Zonula occludens* oder *Tight junctions*, diese sind dann circa 15 Nanometer stark. Die starke Adhäsion der Plasmamembranen in diesen Bereichen wird durch spezifische Membranproteine, vor allem die Occludine und Claudine erreicht. Wenn an Epithelzellen von apikal nach basal *Zonula occludens*, *Zonula adhaerens* und *Maculae adhaerentes* auftreten, nennt man diesen Haftkomplex *junctional complex* oder *terminal bar*. Lichtmikroskopisch

werden diese Strukturen als Schlussleisten identifiziert. Bedeutend als Zell-Zellverbindung und für die interzelluläre Kommunikation sind weiterhin spezifische porenartige Kanäle aus Membranproteinen, die den Austausch kleinerer Moleküle und elektrischer Aktivität zwischen Zellen ermöglichen. Diese Kanäle sind Nexus (*Gap junctions*), die aus mehreren gewebespezifischen Connexin-Untereinheiten bestehen. Elektronenmikroskopisch ist der Membranabstand in diesem Bereich auf zwei bis vier Nanometer vermindert (Junqueira et al. 1996; Kühnel 2002; Zihni 2016).

Cadherine sind Glykoproteine mit wenigstens einer Transmembrandomäne, deren zumeist homophile intermolekulare Bindung der Ektodomänen von der Anwesenheit von Calcium-Ionen abhängig ist. Sie kommen in *Adherens junctions* und Desmosomen vor und sind bedeutend in der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte, der embryonalen Morphogenese, der Zellpolarität und der Signaltransduktion (Pokutta und Weis 2007). Cadherine und das Cytoskelett beeinflussen sich wechselseitig (Theveneau und Mayor 2012). Mit Hilfe von Aktin-Filamenten bilden Cadherine Cluster in Zellkontakten (Lecuit und Yap 2015). Das klassische E-Cadherin kommt hauptsächlich in Epithelien vor und wurde im Huhn zuerst unter dem Namen L-CAM beschrieben (Gallin et al. 1983). Es besitzt fünf Ektodomänen, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne und gehört zu den Typ I Cadherinen. Intrazellulär können solche Cadherine in *Adherens junctions* an p120-Catenin,  $\beta$ -Catenin,  $\alpha$ -Catenin, Vinculin, Myosin VI und dadurch indirekt an Aktin-Filamente binden. Im Gegensatz dazu sind die desmosomalen Cadherine (u.a. Desmocollin, Desmoglein) in den Desmosomen intrazellulär an Intermediärfilamente über unterschiedliche desmosomale Bindepartner (u.a. Plakoglobin) assoziiert (Pokutta und Weis 2007; Lecuit und Yap 2015). Die Transmembrandomäne des E-Cadherin kann mittels p120-Catenin auch Mikrotubuli binden (Theveneau und Mayor 2012). E-Cadherin vermittelte Zellkontakte spielen wichtige Rollen in verschiedenen Signaltransduktionswegen, unter anderem im Rho-Signalweg, der Myosin II aktiviert. Die Balance von Rho-Aktivatoren und -Inhibitoren wird durch den Cadherin-Catenin-Komplex gesteuert, so dass auf diese Weise Cadherin vermittelte Zellkontakte die Polymerisation von Aktin durch Aktin-Regulatoren und Cortactin steuern (Lecuit und Yap 2015). Darüberhinaus ist  $\beta$ -Catenin, der intrazelluläre Bindungspartner der Cadherine zugleich auch ein wichtiger Effektor des Wnt-Signalweges und verbindet ihn somit mit E-Cadherin und der Zelladhäsion. Der Wnt-Signalweg ist sowohl an vielen Prozessen der embryonalen Entwicklung als auch bei der Tumorentstehung und Onkogenese beteiligt (Gall und Frampton 2013). Cadherin-abhängige Zellmigration kommt bei vielen Arten von Krebs vor, ebenso wie bei der Migration von Myofibroblasten, Neuronen und Glia-Zellen

(Theveneau und Mayor 2012). Mesenchymale Zellen entstehen während der Entwicklung durch epithelial-mesenchymale Transition. Dabei verlieren die Epithelzellen zunächst die stabilen Zellkontakte, erhalten eine von ihrer ursprünglichen epithelialen Entwicklungssituation verschiedene Ausstattung von Cadherinen auf ihrer Zelloberfläche und können mit Hilfe von Proteasen durch die Basallamina ins Mesenchym wandern (Theveneau und Mayor 2012). Dieser Transformationsprozess kommt interessanterweise sowohl in der Embryogenese als auch der Karzinogenese vor. Die entstandenen mobilen Mesenchymzellen exprimieren kein E-Cadherin mehr. Im umgekehrten Prozess, der mesenchymal-epithelialen Transition, weisen die Zellen wieder Expression von E-Cadherin auf und finden sich in epithelialen Zellverbänden mit entsprechenden stabilisierten Zellkontakten wieder. Auf diese Weise kann der Verlust von E-Cadherin bei vielen Tumoren, wie Brustkrebs, Magenkrebs, Kolorektalkarzinom oder hepatozellulärem Karzinom die Metastasierung begünstigen. Umgekehrt kann auch eine erhöhte E-Cadherin-Dichte das Wachstum und Überleben einiger Tumoren, wie beispielsweise Glioblastome und Eierstockkrebs, positiv beeinflussen (Gall und Frampton 2013). Beides zusammen zeigt eindrücklich den enormen Einfluss der Cadherine auf die Morphogenese und Homoestase in epithelialen Zellverbänden.

Auch im Haushuhn ist E-Cadherin an der Entwicklung vieler epithelialer Gewebe beteiligt (Gallin et al 1983; Takeichi 1988). Zu seiner Rolle bei der Morphogenese der Lunge gibt es im Haushuhn jedoch kaum Untersuchungen. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von E-Cadherin an Organpräparaten und auf Paraffinschnitten von E8 bis E18 Hühnerlungen mit Immunfärbungen gezeigt (Rau 2011; Bertemes 2012; Hempel 2017). Es zeigte sich hier stets eine klare, apikal betonte Verteilung von E-Cadherin bei den Immunfärbungen des Epithels (Rau 2011; siehe Abb. 9). Die genaue subzelluläre Verteilung von E-Cadherin in Lungenepithelzellen des Haushuhns während der Entwicklung ist jedoch weitgehend unbekannt.



**Abbildung 9:** Anti-E-Cadherin (Ecad)-Markierung der Zellkontakte des Epithels (Ep) eines Parabronchus auf einem Paraffinschnitt einer Hühnerlunge im Entwicklungsstadium E10. Nicht markiert ist das Mesenchym (Me). Präparat von E. Hempel.

### 2.3.2 Der Zellkern und der Transkriptionsfaktor SOX2

Der Zellkern steuert mittels des genetischen Materials die Entwicklung und Funktion der Zelle. Die Kernhülle umschließt das Chromatin und wird durch Kernporen unterbrochen. Durch diese steht das Nukleoplasma im Kontakt mit dem Zytoplasma. Das Chromatin unterteilt sich in elektronendichtes Heterochromatin und weniger elektronendichtes granuläres Euchromatin. Ein bis mehrere Nucleoli, auch Kernkörperchen genannt, können aber müssen nicht vorhanden sein. Die genetische Information wird mittels Transkription, gesteuert durch Transkriptionsfaktoren, weitergegeben (Junqueira et al 1996).

SOX2, SRY-box 2 (SRY abgeleitet von geschlechtsbestimmender Region des Y-Chromosoms) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine große Bedeutung in der embryonalen Entwicklung und der Aufrechterhaltung embryonaler und adulter Stammzellen hat. Die SOX-Proteine haben eine hochkonservierte DNA-bindende Domäne, HMG – Box (*high mobility group box*) Domäne genannt. Acht Gruppen, A bis H werden unterschieden. SOX2 gehört der Untergruppe B1 an und bindet in Abhängigkeit anderer Faktoren an die DNA (Ishii et al. 1998). Größere Bekanntheit erlangte SOX2 als Reprogrammierungsfaktor, der gemeinsam mit weiteren Transskriptionsfaktoren (OCT4, NANOG und LIN28) nach ektopischer Expression menschliche somatische Zellen in pluripotente Stammzellen verwandeln kann (Yu et al. 2007). Auch für die Säugerlunge ist der Transkriptionsfaktor von Bedeutung während der Frühentwicklung des Organs und für die weitere Spezifizierung des Entoderms. Beispielsweise wird SOX2 in der Säugerlunge von den proximalen entodermalen Progenitorzellen exprimiert und bedingt die weitere Differenzierung in verschiedene Typen von Epithelzellen, unter anderem neuroendokrine, sekretorische und Schleimhautzellen (Herriges und Morrisey 2014). Gontan und Kollegen (2008) konnten zeigen, dass in transgenen Mäusen eine Überexpression von SOX2 die bronchiale Verzweigung und Bildung von Alveolen hemmt, ebenso wie die Differenzierung von Progenitorzellen. In Wildtyp-Mäusen ist hingegen die Expression von SOX2 in Verzweigungen der Bronchien reduziert (Gontan et al. 2008).

Auch bei der Entwicklung des Haushuhnes spielt das SOX2-Gen eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung des Entoderms (Ishii et al. 1998). Es tritt ab dem Entwicklungsstadium E1,5 im Bereich des künftigen Vorderdarms, später auch in weiteren Darmabschnitten und Anhangsorganen auf (Matsushita et al. 2008). SOX2-Faktoren werden außerdem vor Beginn der epithelialen Morphogenese und Zelldifferenzierung im Bereich der laryngotrachealen Knospe und Lungenanlage exprimiert. Während der Entwicklung des Lungengewebes sinkt die Expression im Epithel ab. Bei E4 tritt die Expression von SOX2 deutlich in den

beginnenden primären Bronchien, außer ihren distalen Spitzen auf. In der Entwicklung der sekundären Bronchien wird es noch in den proximalen Anteilen gefunden. Bis E9 ist SOX2 im Epithel der primären Bronchien anzutreffen (Ishii et al. 1998). In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde SOX2 auf Paraffinschnitten der Hühnerlunge von E8 bis E18 mit immunzytochemischen Färbungen detektiert. Im frühen Stadium E8 wird hauptsächlich das Epithel markiert, während zu E18 deutlich die atriale Muskulatur angefärbt wird und die epitheliale Färbung in den Hintergrund tritt. Somit ergab sich im Stadium E18 bei der Färbung mit Anti-SOX2 ein ähnliches Bild wie mit einer Immunfärbung des mesenchymalen Markers Anti-sma (*smooth muscular actin*; Rau 2011). Im Rahmen ihrer lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Entwicklung der Luftsäcke im Haushuhn hat Elisabeth Hempel (2017) SOX2 ebenfalls in der Lunge (siehe Abb. 10) und insbesondere im Epithel der Luftsäcke nachgewiesen. Es scheint einen proximal zu distal abfallenden Gradienten in der Expressionsstärke von SOX2 zu geben, ebenso scheint möglicherweise eine Verschiebung der Expression vom Epithel in frühen Entwicklungsstadien hin zum Mesenchym in späteren Entwicklungsstadien stattzufinden (Ishii et al. 1998; Rau 2011). Dieses konnte in der Literatur bisher noch nicht genauer dargestellt und quantifiziert werden, auch unter dem Gesichtspunkt, dass das Epithel eine sehr hohe Zelldichte im Vergleich zum lockeren Mesenchym aufweist und somit im Lichtmikroskop das Epithel vermeintlich stärker markiert ist als das Mesenchym.



**Abbildung 10:** Anti-SOX2(SOX)-Markierung der Zellen des Epithels (Ep) und des Mesenchyms (Me) eines Parabronchus auf einem Paraffinschnitt einer Hühnerlunge im Stadium E12. Präparat von E. Hempel.

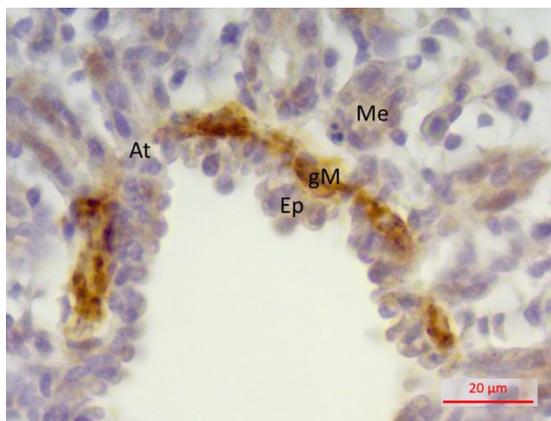
### 2.3.3 Die glatte Muskulatur und das glattmuskuläre Aktin

Glatten Muskelzellen werden auf Grund ihrer fehlenden, für quergestreifte Muskulatur charakteristischen Streifen so benannt. Sie sind für die unwillkürlichen, langsamen Bewegungen der inneren Organe verantwortlich (Junqueira et al. 1996). Charakteristisch für glatte Muskelzellen ist ihre spindelförmige Gestalt mit zentral gelegenen Zellkern, der bei Kontraktion abflacht oder gefaltet ist. Sie liegen bündelförmig überlappend, verbunden durch ein dichtes Endomysium und umgeben von einem Perimysium. Intrazellulär sind längsausgerichtete Myofilamente erkennbar. Zellorganellen wie Mitochondrien finden sich in Regionen neben dem Zellkern oder in taschenförmigen Ausbuchtungen der Zellmembran. Auffallend sind unter der Zellmembran liegende Invaginationen, sogenannte *Caveolae*, als Kalziumspeicher. In den Filamenten und zwischen Filamenten und Zellmembran sind *Area densae* oder *Dense spots* beziehungsweise *Dense bodies* sichtbar. Diese Verdichtungen dienen der Verbindung der Filamente untereinander, mit intermediären Filamenten und der Zellmembran. Durch *Gap junctions* sind anliegende Zellen verbunden (Junqueira et al. 1996; Stephens 2001; Kühnel 2002). *Dense spots* an der Zellmembran werden auch als *Dense bands* bezeichnet und können in zwei benachbarten Zellen über die Zellmembranen miteinander verbunden sein. Solche *Attachement plaques*, aus zwei *Dense bands* verbinden über Vinculin, Talin und alpha-Aktinin Aktin-Filamente mit den Transmembranproteinen aus der Integrinfamilie. Sie übertragen die Kontraktion zwischen den Zellen und auf die extrazelluläre Matrix. Im Zytoplasma gelegene *Area densa* werden als *Dense bodies* bezeichnet und sind bis zu 1,5 Mikrometer lang. Sie verbinden längs Aktin-Filamente und an ihren Enden intermediäre Filamente. Die Aktin-Filamente sind etwa sieben Nanometer dick. Sie werden von 12 bis 15 Nanometer dicken Myosinfilamenten umgeben. Die intermediären Filamente erreichen einen Durchmesser von zehn Nanometer (Gunst und Tang 2000).

Aktin kommt in den Zellen als globuläres G-Aktin und aneinandergereiht als filamentäres F-Aktin vor. Die Filamente sind doppelsträngige helikale Polymere, die sich schnell aus globulärem Aktin bilden und wieder auflösen können. Diese Prozesse werden unter anderem von Gelsolin und Profilin gesteuert. Aktin bindet viele Proteine, wie zum Beispiel Tropomyosin, Caldesmon und Calponin. Es werden vier verschiedene Isoformen unterschieden: alpha- und gamma- „kontraktil“ Aktin, und beta- und gamma- „zytoskelettales“ Aktin. Alpha-Aktin steht mit den *Dense bodies* und den *Dense bands*, sowie mit Myosinfilamenten in Verbindung (Gunst und Tang 2000; Stephens 2001). Da Aktine hochkonservierte Proteine in eukaryotischen Zellen sind, ist ihre Aminosäuresequenz zu über 90% homolog. Allerdings sind sie in ihrem N-terminus nur zu 50 bis 60 % homolog. An

dieser Stelle können spezifische Antikörper ansetzen um die einzelnen Isoformen unterscheidbar zu machen (Skalli et al. 1986). *Alpha - smooth muscle actin* wurde in vaskulären glatten Muskelzellen verschiedener Organe im Menschen und der Ratte beschrieben (Skalli et al. 1989). Im Huhn wurde *alpha - smooth muscle actin* im Gastrointestinaltrakt in unterschiedlichen Konzentrationen abhängig von der Region und der Muskelschicht gefunden (Yamamoto et al. 1996).

Bei der erwachsenen Hühnerlunge gehen aus dem parabronchialen Lumen die Atrien hervor. Diese werden in ihrem Eingang von einem Netz aus glatter Muskulatur, *Musculi atriales*, umgeben und grenzen sich durch interatriale Septen voneinander ab (Maina 2005). Auch Makanya und Kollegen (2011b) beschreiben anti-*alpha - smooth muscle actin* positive Zellen an den Spitzen der interatrialen Septen. Diese kommen sonst nicht weiter im Gasaustauschgewebe oder den interatrialen Septen vor. Es wird vermutet, dass sie den Luftstrom in die Atrien oder durch die Parabronchien regeln (Makanya et al. 2011a; Makanya et al. 2011b). Parabronchien der Hühnerlunge sind im Entwicklungsstadium E8 von einer unterbrochenen Schicht *alpha - smooth muscle actin* - positiver Zellen umgeben. Im Stadium E12 werden diese Unterbrechungen häufiger und schmaler. Hier beginnen sich die ersten epithelialen Zellen ins Mesenchym vorzuwölben (Makanya et al. 2006). In unserer Arbeitsgruppe wurde auf Paraffinschnitten embryonaler Hühnerlungen der Entwicklungsstadien E8 bis E18 glattmuskuläres Aktin immunzytochemisch angefärbt. Hier wurde die bei E8 noch geschlossene Schicht des mit Anti-*alpha - smooth muscle actin* markierten Mesenchyms um das parabronchiale Epithel deutlich. Diese wird ab E10 unterbrochen. In späteren Entwicklungsstadien tritt dann immer deutlicher die abschnittsweise Verteilung der atrialen Muskulatur hervor (Rau 2011). Auch auf den von Elisabeth Hempel hergestellten Präparaten ist die atriale Muskulatur ersichtlich (Hempel 2017; siehe Abb. 11). Bisher liegen keine Studien vor, in denen *alpha - smooth muscle actin* ultrastrukturell auf embryonalen Hühnerlungen untersucht wurden.



**Abbildung 11:** Anti-*alpha - smooth muscle actin* -Markierung der glattmuskulären Mesenchymzellen (gM) der atrialen Muskulatur zwischen den Atrien (At) eines Parabronchus auf einem Paraffinschnitt einer Hühnerlunge im Stadium E16. Epithel (Ep). Mesenchym (Me). Präparat von E. Hempel.

### 2.3.4 Die Basallamina und das Laminin

Die Basalmembran trennt zumeist Epithelien oder Endothel vom umgebenden Bindegewebe, umgibt aber beispielsweise auch Muskelzellen und Nervenzellen. In ihr unterscheidet man Basallamina und *Lamina fibroreticularis*. Die Basallamina wird vom Epithel gebildet und setzt sich aus *Lamina rara* oder *Lamina lucida* und der *Lamina densa* zusammen. Sie ist 20 bis 100 Nanometer dick und hat wichtige Aufgaben in der Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Formgebung von Zellen (Junqueira et al. 1996). Bereits zum Bindegewebe zugerechnet wird die *Lamina fibroreticularis*. Sie wird durch kollagene Fibrillen aufgebaut und ist durch Fibronectin mit der *Lamina densa* verbunden. Bei aufeinandertreffenden epithelialen und endothelialen Basallaminae, wie in der Lunge, fehlt sie. Hier wird die elektronendurchlässige Schicht, die am Endothel anliegt, *Lamina rara interna* und die am Epithel anliegende *Lamina rara externa* genannt (Köpf-Maier und Merker 1989; Junqueira et al. 1996; Sannes und Wang 1997). Neuere Verfahren, wie die Kryofixation legen nahe, dass diese elektronenhellen Schichten ein Dehydratationsartefakt sind (Sannes und Wang 1997; Hohenester und Yurchenco 2013). Grant und Kollegen (1983) beschreiben bei embryonalen Lungen der Ratte Diskontinuitäten der Basallamina, durch die Typ II Pneumozyten mit interstitiellen Zellen Kontakt aufnehmen (Grant et al. 1983). Diese wurden in embryonalen Lungen des Huhnes bisher nicht nachgewiesen.

Laminine sind heterotrimere Glykoproteine und kommen hauptsächlich in der Basallamina vor. Es werden 16 Isoformen unterschieden, die funktionelle und strukturelle Aufgaben erfüllen. Laminin erscheint in der *Lamina densa* und bindet sowohl an die Epithelzellen als auch über Entactin, Fibronectin und Perlecan an Typ IV-Kollagen. Mit Hilfe von Calcium-Ionen können die meisten Laminine Polymere bilden (Hohenester und Yurchenco 2013). Über Integrin- und Nichtintegrin-Rezeptoren, wie Dystroglykane, Syndecane und *Lutheran blood group glycoprotein* nehmen Laminine auch Einfluss auf intrazelluläre Signalwege. Wobei der Dystrophin-Dystroglycan-Komplex Laminin mit intrazellulären Aktin-Filamenten von Muskelzellen verbindet (Schuger 1997; Durbeej 2010). Laminin wird in der embryonalen Säugerlunge sowohl vom Epithel als auch vom Mesenchym gebildet. Dabei spielt es eine wichtige Rolle in dem Verzweigungsmuster der epithelialen Zellstränge (Schuger 1997). Bei den embryonalen Vögeln ist bisher nicht bekannt, wo das Laminin gebildet wird und welche Rolle es genau spielt. Eine beim Menschen bekannte genetische Erkrankung mit gestörtem bis fehlendem Laminin ist die Epidermolysis bullosa junctionalis, die kongenitale Muskeldystrophie Typ 1A und das Pierson Syndrom. An Laminin binden viele invasive Mikroben und Viren (Durbeej 2010). Ebenso spielt es eine Rolle in der Entstehung von Krebs

und der Metastasierung. Die dabei stattfindende epithelial-mesenchymale Transition wird von einer verminderten Expression von Basalmembran bildendem Laminin und einer herabgesetzten E-Cadherin Expression begleitet (Kruegel und Miosge 2010).

Calvitti und Kollegen (2004) fanden bei Hühnerlungen des Entwicklungsstadiums E11 stark immunopositive Expression von Laminin, Fibronectin, Kollagen Typ I und IV an den Seiten der Bronchien und eine schwache Expression an den Wachstumszonen. Auch bei den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte E. Hempel auf Paraffinschnitten der embryonalen Hühnerlunge eine Färbung der Basalmembran mit Anti-Laminin-Antikörpern zeigen (unveröffentlichte Resultate). Weitere Untersuchungen zur Expression des Laminins bei der Hühnerentwicklung liegen bisher nicht vor.

### 3 Zielstellung der Arbeit

Die strukturellen und funktionellen Zusammenhänge in der embryonalen Entwicklung des Gasaustauschgewebes der Vogellunge sind bisher weniger gut verstanden als die vergleichbaren Prozesse bei der Entwicklung der Säugerylunge (Maina 2005; Metzger et al 2008). Die Forschung an Embryonen des Haushuhns *Gallus gallus domesticus* als alternatives Tiermodell gewinnt immer mehr an Bedeutung für die Humanmedizin (Bjørnstad et al 2014). Die Entwicklung der Lunge wird ganz wesentlich durch intensiven Signalaustausch und wechselseitige Induktionsvorgänge zwischen Epithel- und Mesenchymzellen bestimmt. Eine genaue Kenntnis dieser Vorgänge erlaubt damit das Verständnis ähnlicher Entwicklungs- und Krankheitsprozesse mit humanmedizinischer Relevanz, wie beispielsweise die epithelial-mesenchymale Transformation bei der Tumorentstehung (Gall und Frampton 2013).

Methodisch wurden für die Untersuchungen des Gasaustauschgewebes der Vogellunge die Lichtmikroskopie zur Übersicht der Organhistologie, die Transmissions-elektronenmikroskopie zur Erfassung der Ultrastruktur und funktionellen Charakterisierung und ergänzend die Rasterelektronenmikroskopie genutzt.

Die Transmissionselektronenmikroskopie an Epon-Ultradünnschnitten erlaubt die Untersuchung der intra- und extrazellulären Ultrastruktur des parabronchialen Epithels und des Mesenchyms. Die parallele Aufarbeitung des Gewebes für die Immunelektronenmikroskopie mit dem hydrophilen Einbettmedium LR White soll die Detektion spezifischer Marker-Epitope mit Hilfe goldgekoppelter Sekundär-Antikörper im Gewebe sichtbar machen. Dabei wurde an vorliegende Arbeiten über die Mechanismen der Differenzierung der embryonalen Hühnerlunge der Forschungsgruppe um Herrn Dr. Frank angeknüpft (Rau 2011; Bertemes 2012; Hempel 2017). In diesen Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die Marker Anti-E-Cadherin, Anti-SOX2, Anti-*alpha - smooth muscle actin* und Anti-Laminin auf histologischen Schnitten der embryonalen Hühnerlunge charakteristische Strukturen spezifisch anfärben und somit als Marker für die Darstellung der Interaktionen des Epithels und des Mesenchyms bei der Lungenentwicklung dienen können. Bisher wurde aber noch nicht untersucht ob und wie diese wichtigen Marker im Elektronenmikroskop nutzbar gemacht werden können.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es somit, immunelektronenmikroskopische Protokolle für diese Antikörper für die Untersuchung der embryonalen Hühnerlunge zu entwickeln, zu überprüfen und die Ergebnisse mit ultrastrukturellen Beobachtungen in Beziehung zu setzen.

Antikörper gegen E-Cadherin markieren die Zellkontakte des parabronchialen Epithels. Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen kann nur vermutet werden, dass Anti-E-Cadherin an

den apikalen Zellkontakten des bronchialen Epithels bindet. In immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen kann der Frage, wo sich das E-Cadherin befindet, genauer nachgegangen werden.

Anti-*alpha - smooth muscle actin* (sma) ist als ausreichend spezifischer Marker für glattmuskuläres Aktin bekannt. Bei diesem Marker soll eine möglichst spezifische Markierung auf elektronenmikroskopischem Niveau erreicht werden, um eine genauere Aussage zur Entwicklung der glattmuskulären Strukturen im Mesenchym und im Bereich der späteren Atrialmuskulatur zu gewinnen.

SOX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung der Lunge eine wichtige Rolle spielt und sich in seiner Konzentration in den verschiedenen Zelltypen des Gewebes im Verlauf der Entwicklung verändert. Für ihn wurden bisher noch keine detaillierten quantitativen Untersuchungen an der embryonalen Hühnerlunge durchgeführt. Die vorliegende Untersuchung soll daher klären, ob die lichtmikroskopisch beobachteten Veränderungen der Anti-SOX2 Markierung des Epithels und des Mesenchyms im Entwicklungsverlauf durch die unterschiedliche Zelldichte bedingt sind oder ob unterschiedliche Konzentrationen an SOX2 vorliegen. Somit soll neben der Entwicklung des immunelektronenmikroskopischen Protokolls für Anti-SOX2 auch eine quantitative Auszählung und Berechnung durchgeführt werden.

Die epithelial-mesenchymale Grenze wird durch eine Basallamina morphologisch angezeigt und kann durch Immunmarkierung mit Anti-Laminin auch funktionell dargestellt werden. Durch eine immunelektronenmikroskopische Untersuchung dieses Antikörpers auf den embryonalen Lungen soll eine Aussage über die genaue Verteilung und eventuell auch die Herkunft des Laminins getroffen werden.

Darüber hinaus sollen die aus der Literatur schon bekannten Erkenntnisse zum Wachstum der Bronchien und der Interaktion des Epithels mit dem Mesenchym überprüft, in die Arbeit integriert und vertieft werden (Maina 2005; Makanya et al. 2011a). Ebenso sollen in dieser Arbeit strukturelle und funktionelle Hinweise auf die möglicherweise bei Hühnern auch vorhandene epithelial-mesenchymale Transition gefunden werden.

Um die dynamischste Phase der Interaktion von Epithel und Mesenchym in der embryonalen Lungenentwicklung des Huhnes zu betrachten, wurden die Experimente auf die Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16 (entsprechend den Tagen der Bebrütung) fokussiert und mit den parallel erhobenen strukturellen Untersuchungen in Beziehung gesetzt.

## 4 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben erfolgten die Versuche bei Raumtemperatur und es wurde stets destilliertes Wasser genutzt. Verzeichnisse über die verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte, Antikörper, Protokolle und Abkürzungen befinden sich im Anhang. Um die spätembryonale Entwicklung der Vogellunge nachzuvollziehen wurden Hühnereier bebrütet. Die Bruteier der Sorte „White Leghorn“ wurden von der Firma VALO BioMedia GmbH aus Osterholz-Scharmbeck bezogen. Die Eier wurden bei 37,8° Celsius und einer Luftfeuchte von 55 % für sechs bis 16 Tage unter automatischem Wenden im Brutgerät HEKA – Turbo 168 bebrütet. Sowohl für die Immunogoldmarkierung als auch für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden für jedes Entwicklungsstadium je drei Tiere verwendet. Für die Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde je Entwicklungsstadium nur eine Lunge genutzt.

### 4.1 Die Herstellung der Präparate

Die präparierten Lungen wurden chemisch, bei 4 Grad Celsius mit den unten genannten Fixiermitteln fixiert. Für die ultrastrukturellen Fragestellungen und die Rasterelektronenmikroskopie geschah die Fixierung in 1%igem Paraformaldehyd (PFA), 2%igem Glutardialdehyd (GA) in phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung (PBS; siehe Protokoll 6 S. XXIX). Paraformaldehyd penetriert die Probe langsam, aber fixiert schnell, während Glutardialdehyd schnell die Probe durchdringt und langsamer fixiert (Polak und van Noorden 1997). Aus diesen Gründen wurden beide Fixiermittel für die ultrastrukturellen Untersuchungen kombiniert. Für die immunologischen Untersuchungen wurde in 4%igem PFA in PBS (siehe Protokoll 5 S. XXIX) fixiert. Hier wurde auf das Glutardialdehyd im Fixativ verzichtet, da es die Antigenität der Proben herabsetzt (Herrera 1992). Die Lungen für die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mindestens sechs Tage bis maximal sechs Wochen im Fixativ belassen. Die lange Zeit von mehreren Wochen war durch die zeitaufwendige Einbettung und die hohe Zahl der Proben bedingt. Es wurde versucht die Zeit im Fixativ so kurz wie möglich, aber so lang wie nötig zu gestalten, um die Epitope für die Immunfärbungen möglichst optimal zu erhalten (Herrera 1992). Für die ultrastrukturelle Transmissionselektronenmikroskopie und die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Lungen zum Teil erheblich länger fixiert, da hier mit keinen so großen Veränderungen zu rechnen ist. Danach wurden die embryonalen Lungen in PBS (siehe Protokoll 2 S. XXVIII) gewaschen, alsdann geteilt und die Probenstücke noch

einmal in Natriumphosphat-Puffer (siehe Protokoll 3 S. XXVIII) gespült. Die Aufteilung der Proben in Stücke von einem bis maximal zwei Kubikmillimetern ist für die Einbettung und das Ultradünnschneiden erforderlich.

Für die immunelektronenmikroskopischen Versuche wurden die Proben in das Einbettmedium LR White (medium grade) eingebettet (siehe Protokoll 12 S. XXXII). LR White ist ein hydrophiles Methacrylat, dem Hydrochinon als Stabilisator gegen spontane Polymerisationen zugesetzt wurde (Lang 2006). LR White eignet sich besonders für die Immunmarkierung, da es nicht so stark vernetzte Polymere wie Epon bildet. Durch die losere Struktur des Harzes und die nur geringe Vernetzung mit biologischem Material können Antikörper leichter an die Epitope binden. Die erhöhte Hydrophilie im Vergleich zu Epon soll zu einer geringeren Hintergrundfärbung führen, da die Bindung der Antikörper an das Einbettmedium verringert wird (Stirling 1990). Die Proben wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in mit LR White gefüllten Gelatinekapseln unter Luftausschluss auspolymerisiert. Auf eine Osmierung der Proben wurde zu Gunsten der besseren Erhaltung der Antigenität verzichtet.

Um die Ultrastruktur der Zellen gut sichtbar zu machen, wurden die Proben in Epon eingebettet (siehe Protokoll 11 S. XXXI). Epon ist ein aliphatisches Epoxydharz basierend auf di- und triglycidyl Ether des Glycerols (Glauert und Lewis 1998). Dabei ist Epon 812 das Harz, Dodecenylnbernsteinsäureanhydride (DDSA) ein Härter, Methylnadicanhydride (MNA) ein weiterer Härter und 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP) der Beschleuniger (Flegler et al. 1995). Die Herstellung von Epon 812 durch die Firma Shell Chemical Co. wurde 1984 eingestellt. Seither wurden viele Nachfolgeprodukte von anderen Firmen auf den Markt gebracht. In dieser Arbeit wird ein alter Vorrat von Epon 812 der Firma Serva verwendet (Glauert und Lewis 1998). Vor der Entwässerung über eine aufsteigende Acetonreihe und dem Einbetten in Epon wurden die Proben mit Osmiumtetroxid osmiert. Osmiumtetroxid dient sowohl der Nachfixierung, hauptsächlich der Lipide der Zellmembranen, als auch der Erhöhung des Kontrastes der Probe im Transmissionselektronenmikroskop (Flegler et al. 1995). Die Einbettung erfolgte in Flacheinbettformen bei Raumluft, die eine gute Ausrichtung der Proben zulassen.

Mit dem Ultramikrotom EM UC7 der Firma Leica wurden Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie und Ultradünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie hergestellt. Für diese Versuchsreihe wurden zumeist Querschnitte der Parabronchien verwendet. Da nicht jedes eingebettete Probenstück die benötigte Ausrichtung besaß, wurden die eingebetteten Präparatestücke der Lungen von den kranial, dorsalen Blöckchen bis zu den kaudal, ventralen angeschnitten und nur die optimal ausgerichteten verwendet. Zuerst wurden

Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,5 Mikrometern angefertigt und mit einer 7%igen Richardson-Färbelösung (siehe Protokoll 13 S. XXXII) gefärbt. Wenn nach Beurteilung des Semidünnschnittes eine Probe gut angeschnitten war, dann wurden mit dem Diamantmesser von der Probe Ultradünnschnitte von circa 50 Nanometer Dicke geschnitten. Diese wurden je nach Fragestellung auf unterschiedliche Netzchen (Grids) für die Transmissionselektronenmikroskopie aufgenommen. Die Ultradünnschnitte der in Epon eingebetteten Proben für die Beurteilung der Ultrastruktur wurden auf 300 mesh Kupfergrids aufgebracht. Die Ultradünnschnitte der LR White Proben kamen auf 400 mesh hexagonale Nickeldünnsteggrids.

Das Kontrastieren der Epon Ultradünnschnitte erfolgte mit einer Bleicitratlösung nach Reynolds und einer Uranylacetatlösung in 50%igem Ethanol (Reynolds 1963; siehe Protokoll 17 S. XXXIV). Die LR White Ultradünnschnitte wurden erst nach der Immunogoldmarkierung mit einer rein wässrigen 7%igen Uranylacetatlösung kontrastiert (siehe Protokoll 18 S. XXXV). Für die Immunmarkierung wurden die Ultradünnschnitte nur mit Uranylacetat kontrastiert, da Bleicitrat ein körniges Bild im Transmissionselektronenmikroskop ergibt. Auch neigt Bleicitrat dazu grobkörnig auszufallen und so den Schnitt zu verschmutzen. Aus diesen Gründen kann es kompliziert sein, die nur Nanometer großen Goldkugeln im Transmissionselektronenmikroskop zu identifizieren, wenn nicht nur mit Uranylacetat kontrastiert wird. Das Kontrastieren der Ultradünnschnitte ist nötig, da biologische Proben selbst nur einen geringen Kontrast im Elektronenstrahl aufweisen. Die Schwermetalle Blei und Uran lagern sich an die Proteine und Nukleinsäuren an und erhöhen so den Kontrast des im Transmissionselektronenmikroskopes erreichten Bildes (Flegler et al 1995).

Um Aufschluss über das Wachstumsverhalten der Parabronchien und die räumliche Interaktion der Epithel- und Mesenchymzellen zu erhalten, wurden von jedem Entwicklungsstadium außerdem vergleichende rasterelektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Dazu wurden die herauspräparierten Lungen in Glutaraldehyd und Paraformaldehyd fixiert, geteilt, entwässert und im Kritisch-Punkt-Trockner getrocknet (siehe Protokoll 30 S. XLI). Dieser spezielle Trocknungsprozess mit flüssigem Kohlendioxid erhält die räumliche Struktur der Zellen, da am überkritischen Punkt von Kohlendioxid abrupte Übergänge von der flüssigen zur gasförmigen Phase, die sich nachteilig auf den Strukturhalt auswirken können, vermieden werden (Flegler et al. 1995). Die Proben wurden auf Probenhalter aufgebracht und anschließend mit einer dünnen Goldschicht in dem Sputtergerät überzogen (siehe Protokoll 31 S. XLII). Diese elektrisch leitende Schicht vermeidet eine elektrostatische Aufladung unter dem Elektronenstrahl (Flegler et al. 1995).

## 4.2 Die Immunogoldmarkierung

Die spezifische Detektion von einzelnen Proteinen und Zellbausteinen in der Immunelektronenmikroskopie erfolgt mit Antikörpern. Der primäre Antikörper bindet an die zu untersuchende Struktur. Um diesen ersten Antikörper sichtbar zu machen wird ein zweiter an kolloidales Gold gekoppelter verwendet. Diese kleinen Goldkörner können gut im Transmissionselektronenmikroskop gesehen werden. Die Immunmarkierung für die Transmissionselektronenmikroskopie kann vor dem Einbetten der Proben (reembedding immunogold staining) oder nach dem Einbetten (postembedding immunogold staining) erfolgen. Die postembedding Verfahren finden auf der bereits ultradünn geschnittenen, eingebetteten Probe statt. Dabei können leicht mehrere Schnitte hergestellt und mit unterschiedlichen Antikörpern markiert werden. Hier werden wesentlich geringere Mengen an Antikörpern benötigt und auch intrazelluläre Strukturen markiert (Herrera 1992; Polak und van Noorden 1997; Lang 2006).

Es fanden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper Verwendung. Mit monoklonalen Antikörpern erhält man eine höhere Spezifität der Markierung, während die Intensität der Färbung bei polyklonalen Antikörper höher ist (Herrera 1992). Für die Immunmarkierung charakteristisch ist die hohe Störanfälligkeit der Methodik. Falsch negative Ergebnisse resultieren aus zu gering konzentrierter Antikörperlösung oder Zerstörung des Antigens beziehungsweise des Antikörpers im Prozess (Herrera 1992). Hintergrundmarkierung als falsch positives Ergebnis kann durch Kreuzreaktivität und unspezifische Bindung der Antikörper entstehen. Um sie zu reduzieren kann die Spezifität des Antikörpers mit seiner Verdünnung gesteigert werden oder unspezifisch bindende Gruppen können im Gewebe blockiert werden. Dies geschieht durch eine Mischung verschiedener Proteine zum Beispiel aus Tierseren in einem Block-Puffer. Wobei die verwendeten Tierseren mit den Arten der Antikörperproduzenten und der Antikörper abzustimmen sind, um ungewollte Bindungen zu vermeiden. Es sollte in dem Block-Puffer unimmunisiertes Serum von der Tierart, von der auch der sekundäre Antikörper stammt, enthalten sein (Lang 2006). In dieser Arbeit stammten die sekundären Antikörper von der Ziege, folglich enthält der Blocking-Puffer unter anderem Tween 20, Kaltwasserfischgelatine, Rinderserumalbumin Fraktion V, Ziegen Serum und Ovalbumin Grad fünf. Um unspezifische Bindungen des goldgekoppelten Antikörpers an die Gewebe zu erkennen, wird eine Kontrolle mitgeführt. Bei dieser wird auf den primären Antikörper verzichtet, ansonsten erfolgen alle Inkubationsschritte in gleicher Weise. Bei der Auswertung im Transmissionselektronenmikroskop sollten hier nur vereinzelt Goldkörner zu finden sein.

Zur Markierung mit Antikörper-gekoppeltem kolloidalem Gold wurden Ultradünnschnitte auf Nickelgrids verwendet. Hierbei wurde für jeden verwendeten primären Antikörper die optimale Konzentration getestet, bei der die geringste Hintergrundfärbung bei guter Markierung zu erreichen war. Zur Optimierung wurden die Protokolle teils weiter adaptiert, beispielsweise für die Immunofärbung mit *anti-alpha – smooth muscle actin*. Für jedes Entwicklungsstadium (E10, E12, E14, E16) wurden drei Tiere ausgewählt. Die Markierung der verschiedenen Antigene erfolgte im Allgemeinen an Serienschnitten.

Der primäre Antikörper wurde in Verdünnungen von 1:50 bis 1:2000 in Blocking-Puffer genutzt. Der zweite Antikörper ist mit kolloidalem Gold gekoppelt und richtet sich gegen den ersten Antikörper. Bei der Größe des Goldes muss ein Kompromiss zwischen guter Sichtbarkeit im Transmissionselektronenmikroskop und guter Diffusionsfähigkeit gefunden werden (Polak und van Noorden 1997). Goldgekoppelte Antikörper mit den Größen fünf, zehn und fünfzehn Nanometer wurden verwendet. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 1: 40 in EM-Puffer verwendet (siehe Protokoll 25 S. XXXVIII). Die Ultradünnschnitte wurden im Anschluss an die Markierung kontrastiert (siehe Protokoll 18 S. XXXV), und sowohl vor als auch nach der Markierung mikroskopiert.

E-Cadherin wurde mit einem monoklonalen Maus-Antikörper detektiert (Material Number: 610181, Lot Number: 20080, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien). Als sekundärer Antikörper dienten mit zehn Nanometer großem Gold gekoppelte Anti-Maus Antikörper der Ziege. Der Anti-Ecad-Antikörper wurde 1:100 verdünnt und der Gold-gekoppelte Antikörper 1:40 (siehe Protokoll 26 S. XXXIX). SOX2 wurde mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper (Clone: AB5603, Lot Number: 1956419, EMD Millipore Corporation, Temecula California, USA) markiert. Der sekundäre Antikörper war an 15 Nanometer große Goldkörner gekoppelt. Anti-SOX2 wurde in der Verdünnung 1:100 und der Gold-gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper in 1:40 verwendet (siehe Protokoll 27 S. XL). Für die Färbung mit *Anti-alpha – smooth muscle actin*-Antikörpern wurden verschiedene Protokolle und Varianten ausgetestet. *Anti-alpha – smooth muscle actin* ist wie Anti-E-Cadherin ein monoklonaler Maus-Antikörper (Clone: 1A4, Product Number: A5228, Lot Number: 073M4768V, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim, Deutschland), so dass wiederum der Ziege-Anti-Maus Antikörper mit zehn Nanometer großem Gold in der Konzentration 1:40 genutzt wurde. Eine Verdünnung des primären Antikörpers mit 1:1000 und der Zugabe von 1% Perfect-Block<sup>TM</sup> zum Blocking-Puffer ergab die besten Resultate (siehe Protokoll 28 S. XL). Laminin wurde mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper in der Verdünnung 1:20 markiert (Product Number: L9393, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim, Deutschland). Der sekundäre Antikörper in der Verdünnung 1:40 war an zehn Nanometer kolloidales Gold gekoppelt (siehe Protokoll 29 S. XLI).

### 4.3 Die Auswertung

Für den ersten Überblick wurden exemplarisch lupenmikroskopische Aufnahmen der präparierten Lungen von E6 bis E16 angefertigt. Um einen Überblick über die Gewebe zu erhalten, wurden lichtmikroskopische Fotos der mit Richardson-Färbelösung gefärbten Semidünnschnitte angefertigt. Diese Fotos dienten der räumlichen Orientierung im Transmissionselektronenmikroskop und der Zuordnung elektronenmikroskopischer Fotos zu lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen. An Serienschnitten konnte man eine Aussage über das räumliche Wachstumsverhalten der Bronchien im Entwicklungsstadium E10 und vereinzelt der Luftsackansätze an die Bronchien treffen. Diese Ansätze wurden exemplarisch bei den Stadien E8 an einem kranialen Luftsack und bei E14 an einem kaudalen Luftsack licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Um das Wachstumsmuster der Parabronchien ersichtlich zu machen, wurden im Entwicklungsstadium E10 Fotos der in Epon eingebetteten Lungenproben erstellt. Im Transmissionselektronenmikroskop wurden Aufnahmen in einer Vergrößerung zwischen 3.000 bis 30.000 fach gemacht. Für das Entwicklungsstadium E 10 wurden drei Querschnitte und ein Längsschnitt mikroskopiert. Es wurde dabei in erster Linie das Epithel, das freie Mesenchym zwischen den Parabronchien und das an das parabronchiale Epithel angelagerte Mesenchym untersucht. In ähnlicher Weise wurden auch bei E12 und E14 drei Querschnitte untersucht. Für E16 wurde in den drei Querschnitten das Epithel sowohl zum parabronchialen Lumen als auch in den entstehenden Atrien und *Infundibula* betrachtet, ebenso das Mesenchym um das sich bildende Gasaustauschgewebe und das parabronchiale Lumen.

Die Auswertung der Immunmarkierungen erfolgte nur bei einer als qualitativ gut befundenen Negativkontrolle, bei der nur vereinzelt und unspezifisch Gold gefunden wurde. Zum histologischen Vergleich wurden zu den untersuchten Bereichen im LR White auch ultrastrukturelle Fotos der Epon-Schnitte angefertigt. Die Markierungen mit Anti-E-Cadherin, Anti-Laminin und *Anti-alpha – smooth muscle actin* wurden anhand der TEM Aufnahmen qualitativ ausgewertet. Die Immunfärbungen mit Anti-SOX2 wurden sowohl qualitativ durch Aufnahmen als auch quantitativ ausgewertet.

Bei den mit Anti-SOX2 markierten Schnitten wurden die gebundenen Goldkörner elektronenmikroskopisch ausgezählt. Dazu wurden Zellen ausgewählt, deren Kern gut und vollständig sichtbar war. Das heißt von Zellkernen, die im Schnitt nicht durch Falten, Schmutz oder Löcher beeinträchtigt waren, wurden Aufnahmen erstellt und später am Bildschirm mittels der Software iTEM ausgezählt und vermessen. Goldkörner auf dem Kern und an der Kernmembran wurden als spezifisch gebunden betrachtet und mitgezählt. Je

Entwicklungsstadium und Zellart wurden circa 10 bis 15 Zellen ausgezählt. Die Größe der Zellkerne wurde in Quadratmikrometer gemessen und die Konzentration des Goldes pro Kernfläche ermittelt und zwischen den Zellarten verglichen. Im Stadium E10 wurden an zwei Tieren und bei E12 an drei Tieren zwischen Epithelzellen, freien Mesenchymzellen sowie an die Parabronchien angelagerten Mesenchymzellen unterschieden und die Daten erhoben. Bei E14 und E16 wurden an je drei Tieren die Daten aufgenommen. Hier wurde das Epithel in „tiefes“ Epithel, das heißt dem Mesenchym zugewandtes und in dem Lumen zugewandtes „oberes“ Epithel unterschieden. Das „tiefe“ Epithel bildet die Atrien. Das dem Parabronchus angelagerte Mesenchym wurde in glatte Muskelzellen und „parabronchiales“ Mesenchym differenziert. Die freien Mesenchymzellen wurden auch hier miterfasst, als nicht dem Epithel angelagerte Zellen. Die Berechnungen erfolgten mit Microsoft Office Excel 2007 und SPSS Version 19. Es wurde der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Median berechnet und alle erhobenen Rohdaten in die Berechnung miteinbezogen (siehe Anhang S. XLIV Statistische Ergebnisse der quantitativen Anti-SOX-Immunogolduntersuchung). Arithmetisches Mittel und Standardabweichung beruhen auf einer Normalverteilung. Bei einem geringen Datensatz wie dem vorliegenden konnte eine Normalverteilung nicht beobachtet werden. Für die Berechnungen wurde daher eine Normalverteilung der Werte angenommen. Bei der Mittelwertberechnung wurde ignoriert, dass Dichtewerte nicht addierbar sind. Somit wurde als zusätzlicher Wert zur Beschreibung der Daten der Median angegeben. Dieser ist unabhängig von Normalverteilung und Addierbarkeit von Werten, sowie robuster gegen Ausreißer. Wenn die Mittelwerte über die Rohwerte berechnet werden, werden Tiere mit höherer n-Zahl überbewertet. Wenn die Mittelwerte über die Tiere berechnet werden, werden Mittelwerte von Mittelwerten berechnet, und die Werte von Tieren mit geringer n-Zahl erhalten eine höhere Wertigkeit. Somit wurde sich in dieser Arbeit für eine Berechnung der arithmetischen Mittelwerte über die Rohwerte entschieden. Die relativen Werte wurden über diese arithmetischen Mittelwerte berechnet.

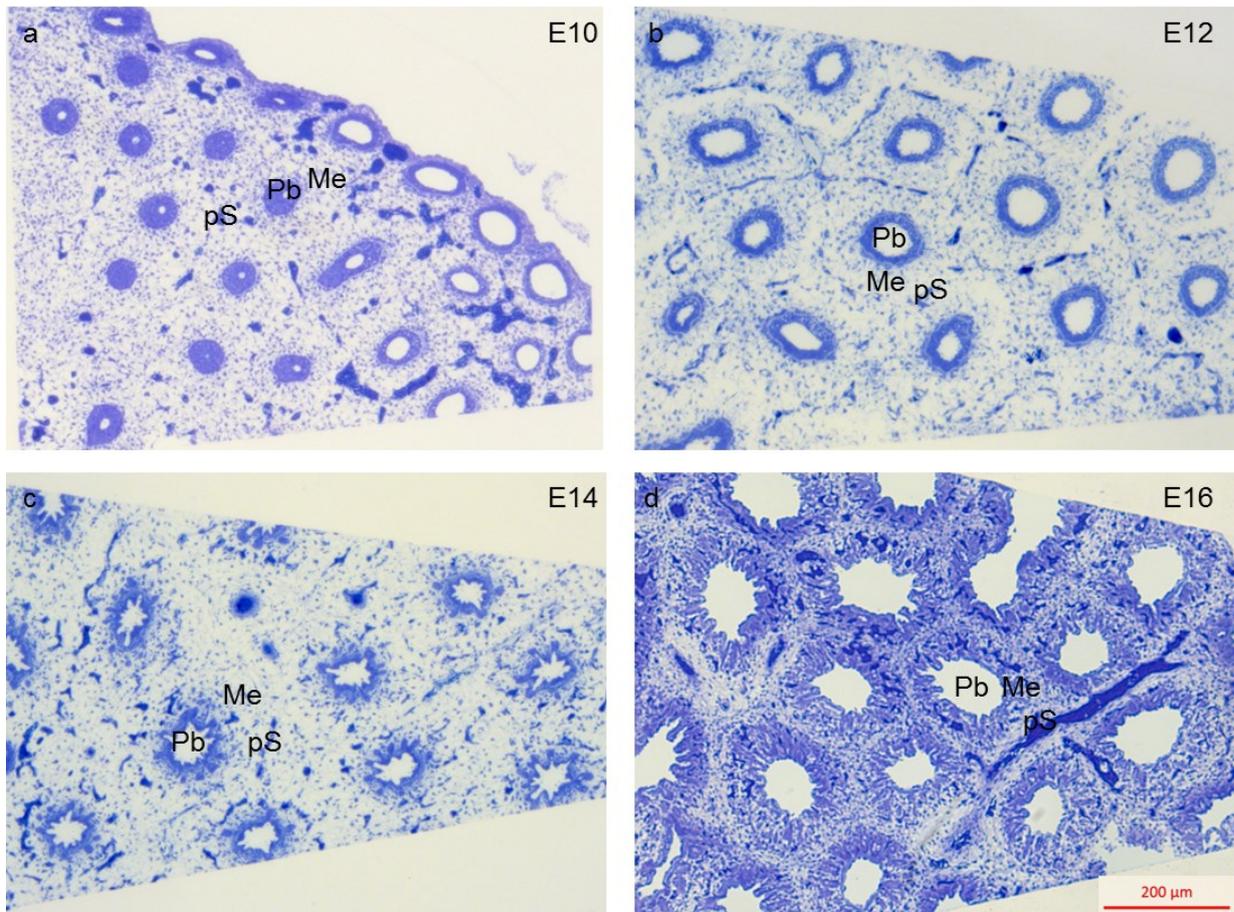
Im Rasterelektronenmikroskop wurden Übersichten über die Probenstücke als auch Detailaufnahmen gemacht. Die Vergrößerung bewegte sich dabei zwischen 42 fach und 10.000 fach. Als Detektor diente der HE-SE2-Detektor, der sowohl die sekundären Elektronen als auch anteilige Rückstreuelektronen aufzeichnet. Lungen der Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16 wurden untersucht.

## 5 Ergebnisse

Um die Beobachtungen nachvollziehbar darzustellen wird in den folgenden Kapiteln auf der Organebene begonnen, über die Histologie zum zellulären und ultrastrukturellen Aufbau übergegangen und schließlich die funktionellen Ergebnisse der Immunmarkierungen dargestellt.

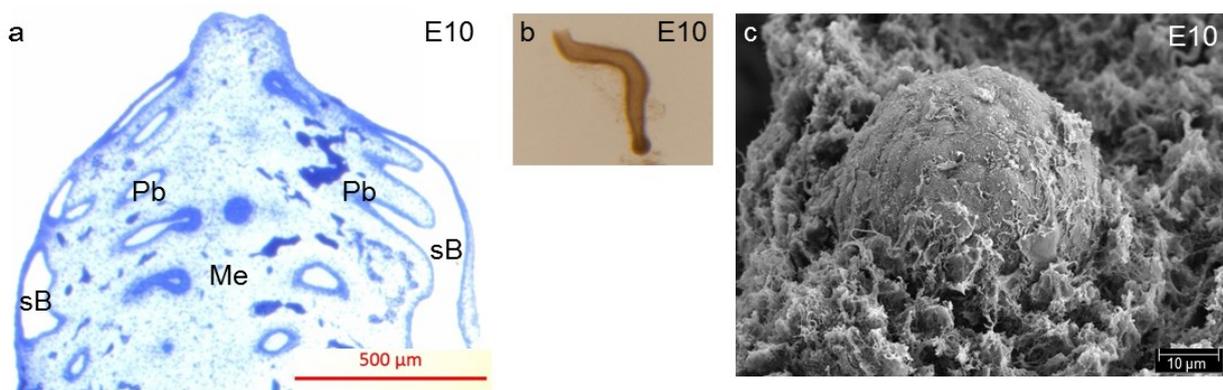
### 5.1 Die Anatomie und Histologie

Im Entwicklungsstadium E6 hat die embryonale Lunge eine längliche Gestalt, die in ihrer gesamten Länge von dem aus der Trachea abgehenden Hauptbronchus durchzogen wird. Die ersten sekundären Bronchien sprossen aus dem Hauptbronchus in das Lungenmesenchym. Ab dem Stadium E8 hat die embryonale Lunge eine abgeflachte beutelförmige Gestalt. Sekundäre Bronchien und die Anlage eines kranialen, eines thorakalen und des großen abdominalen Luftsackes sind bereits vorhanden und als Epithelbläschen ausgehend von den Bronchien an der Lungenoberfläche ersichtlich. Im Stadium E10 sind an der embryonalen Lunge sämtliche Luftsackanlagen und erste aus den sekundären Bronchien aufeinander zu wachsende Parabronchien ersichtlich. Die Bronchien sind Epithelrohre mit einem kreisrunden Querschnitt umgeben von einem breiten Mesenchymmantel. Das Epithel ist öfter hochprismatisch als kubisch aufgebaut und stets einschichtig. Das lockere Mesenchym enthält große Zellzwischenräume zwischen den mit langen Zellfortsätzen ausgestatteten Zellen. Erste Gefäße bilden sich in den interparabronchialen Septen, welche die einzelnen Parabronchien mit ihrem umgebenden Mesenchym voneinander abgrenzen (siehe Abb. 14a und 14b S. 44). Die unter der Lungenoberfläche verlaufenden sekundären Bronchien sind in der Entwicklung weiter und mit einem größeren Lumen und mehr kubischen Epithel ausgestattet. Sie geben die aufeinander zuwachsenden Parabronchien wie in der Literatur beschrieben serienartig ab und haben mehr Blutgefäße in ihrer Nähe als die Parabronchien (siehe Abb. 12a). Im grundsätzlichen Wandaufbau unterscheiden sich die sekundären Bronchien nicht von den Parabronchien, wie in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden kann. Beide sind aus einschichtigem hochprismatischem bis kubischem Epithel und einem unter der Basalmembran verdichteten Mesenchymmantel aufgebaut.



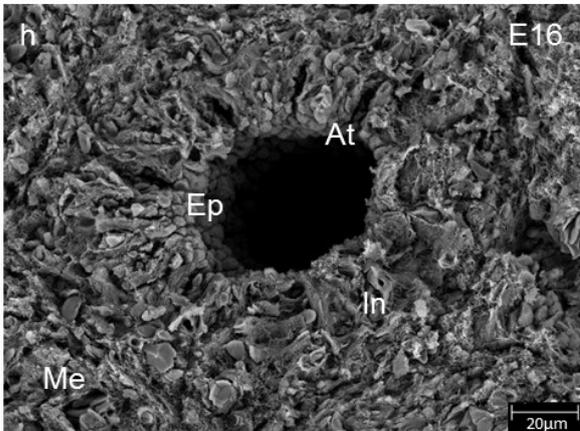
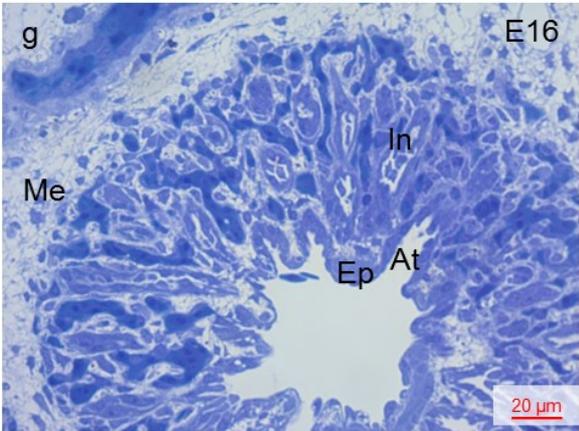
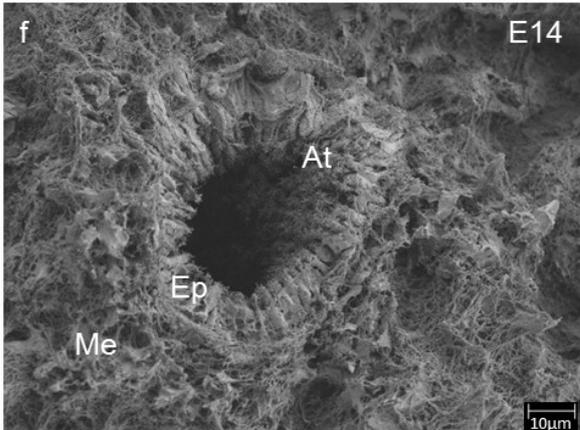
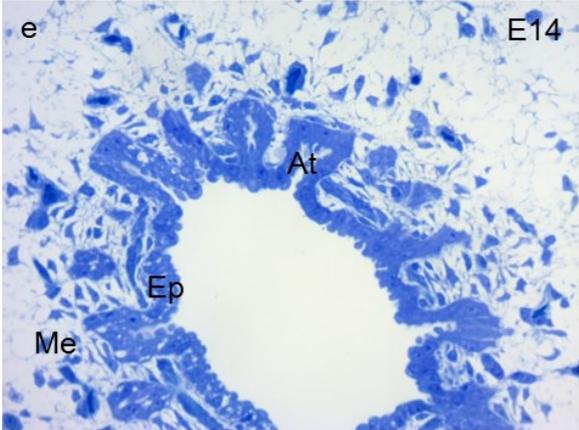
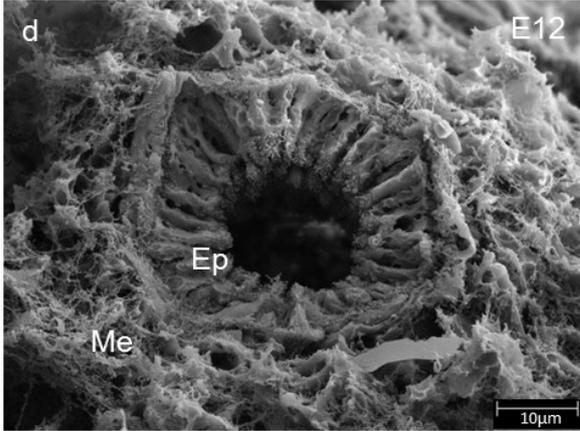
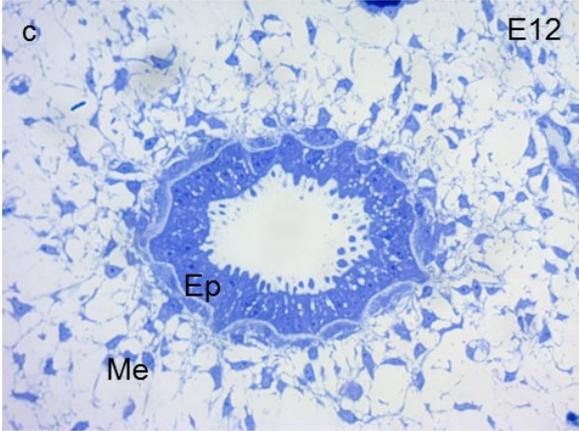
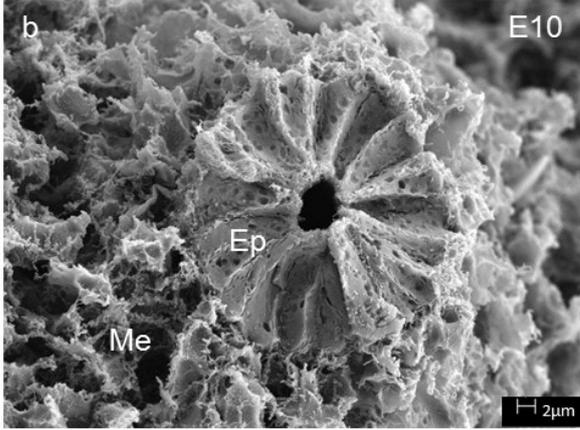
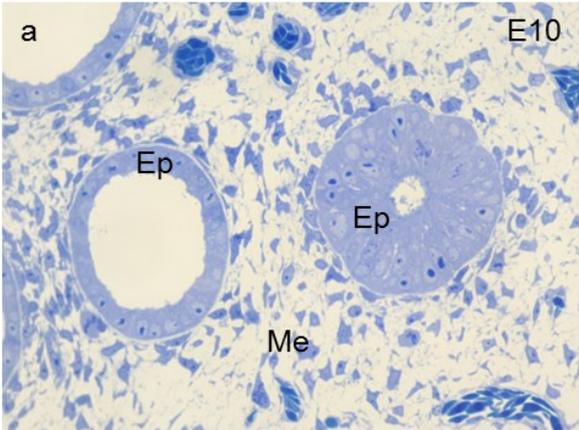
**Abbildung 12:** Lichtmikroskopische Übersicht der parabronchialen Wachstumsmuster bei den Entwicklungsstadien E10 (a), E12 (b), E14 (c) und E16 (d). Von E10 zu E16 dringt das Epithel der Parabronchien weiter ins Mesenchym ein, der die Parabronchien umgebende Mesenchymmantel (Me) wird dünner und die interparabronchialen Septen (pS) werden deutlicher.

Man sieht die zueinander gerichteten kolbenförmig aufgetriebenen Enden der Parabronchien (siehe Abb. 13a), deren dickere Wandbereiche aus dicht gepackten Zellen bestehen. Bisher sind in der Literatur diese Strukturen noch nicht näher beschrieben worden. Im Vergleich zur Wand des restlichen Parabronchiums bestehen diese Wachstumszonen aus, auffällig hohem pseudostratifiziertem Epithel. In das aufgetriebene Ende der Parabronchien erstreckt sich ein spitz zulaufendes Lumen, das sich erst im Bereich der hinteren parabronchialen Wand weitet (siehe Abb. 13b). Diese Beobachtungen konnte sowohl mit Semidünnschnittenschnitten, als auch mit in Epon eingebetteten embryonalen Lungenstücken sowie mit rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden (siehe Abb. 13c).



**Abbildung 13:** Aufeinanderzuwachsen der Parabronchien im Stadium E10.

- (a) Die Parabronchien (Pb) sprossen aus den sekundären Bronchien (sB) aus und wachsen durch das Mesenchym (Me) aufeinander zu.  
 (b) Lupenmikroskopische Aufnahme eines osmierten Parabronchiums mit Knospe eingebettet in Epon.  
 (c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Knospe eines Parabronchus



**Abbildung 14 (gegenüber):** Struktur der Parabronchien im Entwicklungszeitraum E10 bis E16 Lichtmikroskopie (a, c, e, g) und Rasterelektronenmikroskopie (b, d, f, h) im Vergleich. Das bei E10 (a, b) hochprismatische bis kubische Epithel (Ep) der Parabronchien flacht bei E12 (c, d) ab, dringt bei E14 (e, f) in das Mesenchym (Me) vor, bildet die Atrien (At) und verzweigt sich bei E16 (g, h) in die *Infundibula* (In) um das Gasaustauschgewebe zu bilden. Der Maßstab von Abb. 14 g gilt ebenso für Abb. 14 a, c und e.

Im Entwicklungsstadium E12 erreichen beide Lungenflügel eine annähernd keilförmige Gestalt mit den für die Hühnerlunge charakteristischen Sulci costales und Tori pulmonales (siehe Abb. 16a S. 48). In diesem Entwicklungsstadium beginnen die Lungen in die Interkostalräume und die Luftsäcke in die umgebenden Gewebe einzuwachsen. Das Netzwerk aus Parabronchien und Blutgefäßen ist im gefärbten Semidünnschnitt erkennbar (siehe Abb. 12b S. 42). Die Parabronchien haben nun alle den annähernd gleichen Entwicklungsstand und sind mit den gegenüberliegenden Parabronchien vereinigt. Es sind keine parabronchialen Knospen mehr ersichtlich. Der kreisrunde Durchmesser der Parabronchien bleibt erhalten, das Lumen wirkt größer (siehe Abb. 14d). Das einschichtige Epithel ist hochprismatisch mit erkennbaren apikalen Fortsätzen, welche ins Lumen reichen. Das umgebende lockere Mesenchym verdichtet sich unter dem Epithel deutlich, so dass die Basalmembran als dünner Streifen hell hervortritt. Dieses verdichtete Mesenchym, „parabronchiales“ Mesenchym genannt, wird bereits ganz vereinzelt vom Epithel durchbrochen. Das ist ein Anzeichen für die weitere Differenzierung der Parabronchien, die in der Folge mit der Einsenkung der Atrien und Bildung des Gasaustauschgewebes beginnt. Im Stadium E12 ist die Basalmembran nicht mehr gleichmäßig kreisrund wie bei E10, sondern ergibt ein unregelmäßigeres gewundenes Bild (siehe Abb. 14c). In den Aufnahmen ist deutlich die etwa hexagonale Anordnung der Parabronchien mit den nun gut ausgebildeten interparabronchialen Septen erkennbar. Die Gefäße beschränken sich hauptsächlich auf diese Septen und sind erst vereinzelt im sich bildenden Austauschgewebe sichtbar (siehe Abb. 12b S. 42). Im Stadium E14 sind die Sulci costales der Lunge tiefe Kerben (siehe Abb. 1 S. 3). Die angrenzenden Luftsäcke sind mit dem umgebenden Gewebe verwachsen und lassen sich nicht mehr zusammen mit der Lunge präparieren. In der embryonalen Lunge verwächst nun das einschichtige Epithel zunehmend stärker mit dem die Parabronchien umgebenden Mesenchym und dringt in dieses deutlich vor (siehe Abb. 12c S. 42). Das Epithel bildet die Atrien, breite in das Mesenchym reichende Epithelstränge mit dazwischen aufgespannten glatten Muskelzellen als erster Einheit des Gasaustauschgewebes. Das Epithel ist in den sich bildenden Atrien deutlich hochprismatisch und an den dem Lumen zugewandten Orten kubisch (siehe Abb. 14e). Die langen apikalen

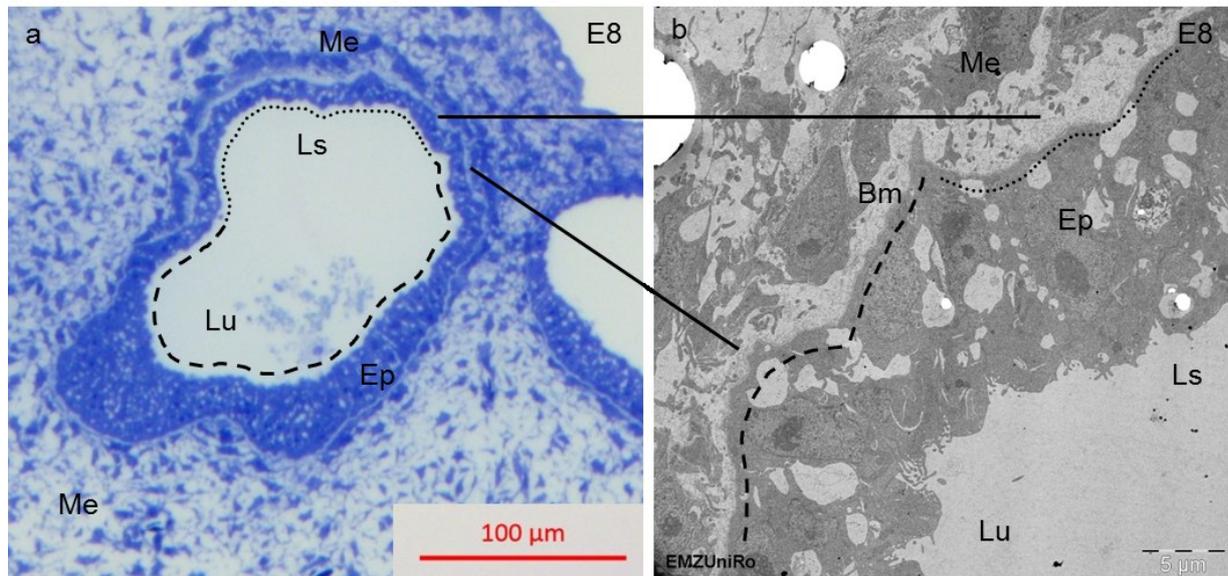
Zellfortsätze sind besonders in den tieferen Epithelanteilen erkennbar. Der die Parabronchien umgebende Mesenchymmantel wird in Folge dieser Differenzierungen schmaler. Die Gefäße, beschränken sich ebenfalls nicht mehr auf die interparabronchialen Septen, sondern dringen bereits bis dicht an das Epithel vor. Das aus locker verbundenen Zellen bestehende Mesenchym zwischen den Parabronchien und den Septen ist erkennbar (siehe Abb. 14f). Die embryonale Lunge ist bei E16 soweit in die Interkostalräume vorgedrungen, das eine Präparation der Lunge in toto unbeschadet aufgrund der Verwachsung nicht immer gelingt. In diesem Entwicklungsstadium ist bereits die Unterteilung in parabronchiales Lumen, sich bildendes Gasaustauschgewebe und interparabronchiale Septen mit den großen Gefäßen sichtbar. Das einschichtige Epithel ist weit in das Mesenchym eingewachsen und beginnt mit den aus den parabronchialen Septen vorgedrungenen Blutgefäßen das Gasaustauschgewebe zu bilden. Dieses besteht in dem Entwicklungsstadium E16 aus den Atrien und den aus diesen als längliche schmale Epithelhohlräume hervorgehenden *Infundibula* (siehe Abb. 14h S. 44). Das Epithel, welches unmittelbar dem parabronchialen Lumen zugewandt liegt, ist flach mit glatter halbkugelförmiger Gestalt. Das Epithel in den Atrien und *Infundibula* beginnt sich ebenfalls abzuflachen. Insgesamt sind keine apikalen großen Zellfortsätze des Epithels mehr vorhanden. Die kleinen Blutgefäße liegen dicht am Epithel an und dringen fast bis an das das Lumen begrenzende Epithel vor. Unter diesem Epithel liegen einzelne, zwischen den Atrien aufgespannte Verbände glatter Muskelzellen. Zwischen diesem dichten Gasaustauschgewebe und den Septen mit den größeren Blutgefäßen ist nur noch ein schmaler Raum des lockeren Mesenchymgewebes lichtmikroskopisch sichtbar (siehe Abb. 14g S. 44).

Von dieser Situation unterscheidet sich der Feinbau der akzessorischen Luftsäcke. Beispielsweise im Entwicklungsstadium E8 konnte der Übergang von einem kranialen Luftsack in die Bronchien vergleichend licht- und elektronenmikroskopisch untersucht werden (siehe Abb. 15). Der strukturelle Aufbau des Luftsackes im Stadium E8 ähnelt grundsätzlich dem des Bronchus. Ein einschichtiges kubisches bis hochprismatisches Epithel wird von einer Schicht dichter gepackter Mesenchymzellen umgeben, um die wiederum ein breites locker aufgebautes Mesenchymgewebe zu finden ist. Beim Luftsackepithel fällt jedoch eine deutlichere Basalmembran im Vergleich zu den Bronchien auf, auch das Epithel ist niedriger und eher kubisch in seiner Zellform. Das Epithel des Bronchus ist hochprismatisch und pseudostratifiziert. Der Ansatz des Luftsackes geht längs in den Bronchus über, als ob der Bronchus im Laufe seines Wachstums den Luftsack abgezweigt hat. Der Übergang der Epithelien von Bronchus zu Luftsack erfolgt indes abrupt (siehe Abb. 15b).

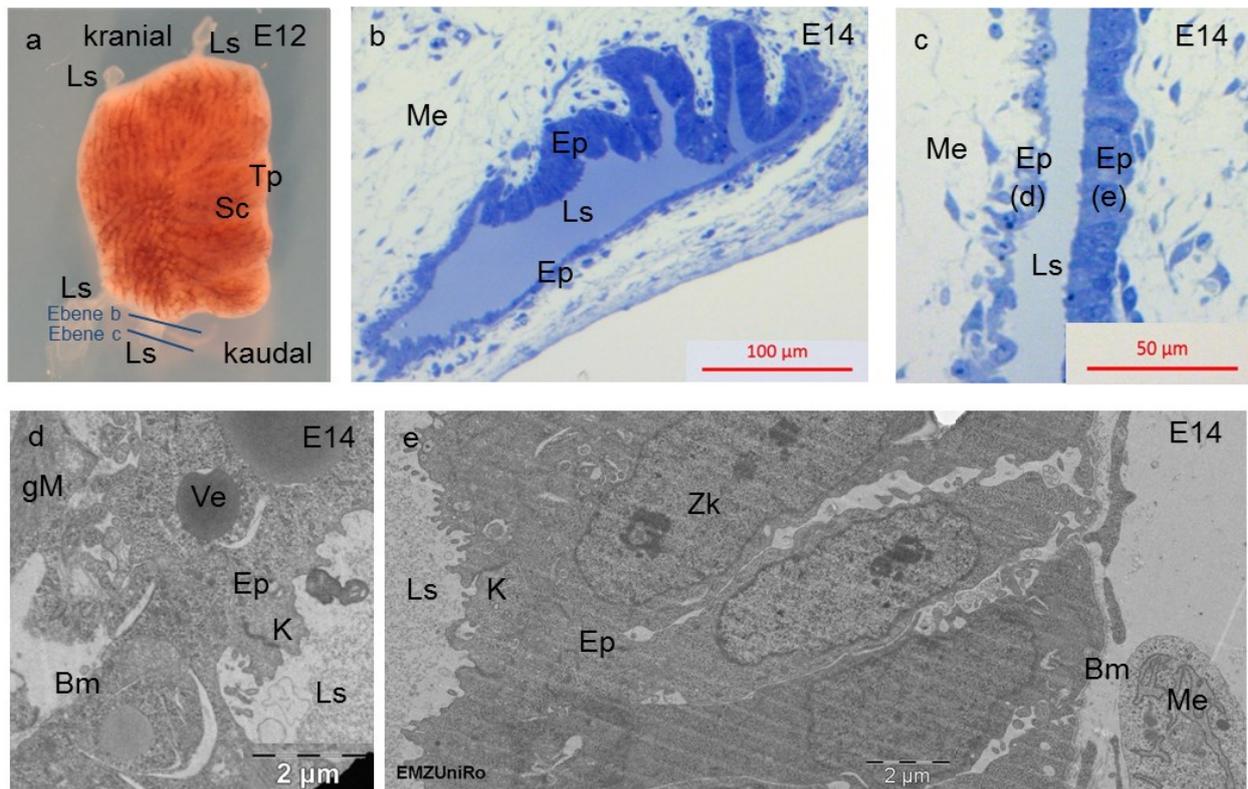
**Abbildung 15:** Übergang eines kranialen Luftsackansatzes in einen Bronchus im Entwicklungsstadium E8.

(a) Semidünnschnitt des Luftsackansatzes (Ls) an den Bronchus (Lu). Das dem Epithel (Ep) direkt anliegende Mesenchym (Me) ist beim Luftsackansatz (gepunktete Linie) dichter und die Basalmembran breiter, als beim Bronchus (gestrichelte Linie).

(b) Transmissionselektronenmikroskopischer Ausschnitt aus Abb.15a. Die Basalmembran (Bm) des Luftsackansatzes (Ls, gepunktete Linie) ist breiter als die des Bronchus (Lu, gestrichelte Linie). Epithel (Ep). Mesenchym (Me).



Im Stadium E14 konnten von einem kaudalen thorakalen Luftsack Serienschritte inklusive Ansatz zu den Bronchien angefertigt werden (siehe Abb. 16a). Der Luftsack geht hier kontinuierlich in den Bereich der Bronchien über (siehe Abb. 16b). Es bilden circa zwei bis drei Bronchien den Übergang zur Lunge. Anfänglich ist ihr Querschnitt flach und unregelmäßig, später gleicht er dem kreisrunden der Parabronchien. Diese Bronchien wiederum gleichen den Parabronchien im lichtmikroskopischen Aufbau. Ein hochprismatisches Epithel ist umgeben von einer Schicht aus dicht gepackten Mesenchymzellen. Das Epithel des Luftsackes ist einschichtig sowohl mit flachen als auch mit hochprismatischen Anteilen (siehe Abb. 16c). Apikal ist die Oberfläche des Luftsackepithels durch mikrovilliartige Fortsätze charakterisiert (siehe Abb. 16e). Zwischen den Zellen befindet sich in Hohlräumen kristalline Substanz und intrazellulär wurden zum Teil große gefüllte Vesikel in der elektronenmikroskopischen Analyse festgestellt. Der Basalmembran liegen mesenchymale Zellen in deutlich lockerer Weise als um die Bronchien an. Vereinzelt sind in den anliegenden Mesenchymzellen auch glattmuskuläre Anteile erkennbar (siehe Abb. 16d).



**Abbildung 16:** Aufbau der Wand eines kaudalen Luftsackes im Entwicklungsstadium E14. Der Wandaufbau zeigt Ähnlichkeiten mit dem Bau der Parabronchien. So finden sich auch hier glattmuskuläre Zellen unter dem Epithel. Die apikale Membran der Luftsäcke zeigt keine so deutlichen Vorwölbungen oder Aposomen in das Lumen, wie das vergleichbare Epithel der Parabronchien (Vergleich Abb. 14e und f S. 44).

(a) Lupenmikroskopische Aufnahme einer Lunge im Entwicklungsstadium E12 mit angrenzenden Luftsäcken (Ls) zur Veranschaulichung der Schnittebenen für den Ansatz des Luftsackes (Ebene b) und des Luftsackes (Ebene c). Sulci costales (Sc) und Tori pulmonales (Tp). Es wurde das Bild einer Lunge im Stadium E12 verwendet, da im Stadium E14 die Luftsäcke nicht mehr so deutlich herauspräpariert werden können.

(b) Semidünnschnitt des Ansatzes eines kaudalen Luftsackes an die Lunge in der Schnittebene b. Das Epithel (Ep) ist zu einem Teil hochprismatisch zum anderen Teil flach und grenzt das Lumen des Luftsackes (Ls) vom Mesenchym (Me) ab.

(c) Semidünnschnitt des kaudalen Luftsackes in der Schnittebene c. Das Lumen des Luftsackes (Ls) wird sowohl von flachem Epithel (Ep(d)) als auch von hochprismatischem Epithel (Ep(e)) umgeben. Mesenchym (Me).

(d) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des flachen Luftsackepithels im Entwicklungsstadium E14. Das Epithel (Ep) umgibt das Lumen des Luftsackes (Ls) und enthält Vesikel (Ve). Zellkontakt (K) zwischen Epithelzellen (Ep). Basalmembran (Bm), glattmuskuläre Mesenchymzelle (gM).

(e) Transmissionselektronenmikroskopisches Bild des hochprismatischen Luftsackepithels. Lumen des Luftsackes (Ls), Epithelzellen (Ep) mit Zellkern (Zk) und Zellkontakten (K). Basalmembran (Bm). Mesenchymzelle (Me).

## 5.2 Der elektronenmikroskopische Aufbau

In den folgenden Kapiteln wird erst der zelluläre Aufbau in den einzelnen untersuchten Entwicklungsstadien von E10 bis E16 dargestellt und anschließend auf elektronenmikroskopisch beobachtbare Besonderheiten der Bildung des Gasaustauschgewebes in der embryonalen Hühnerlunge eingegangen.

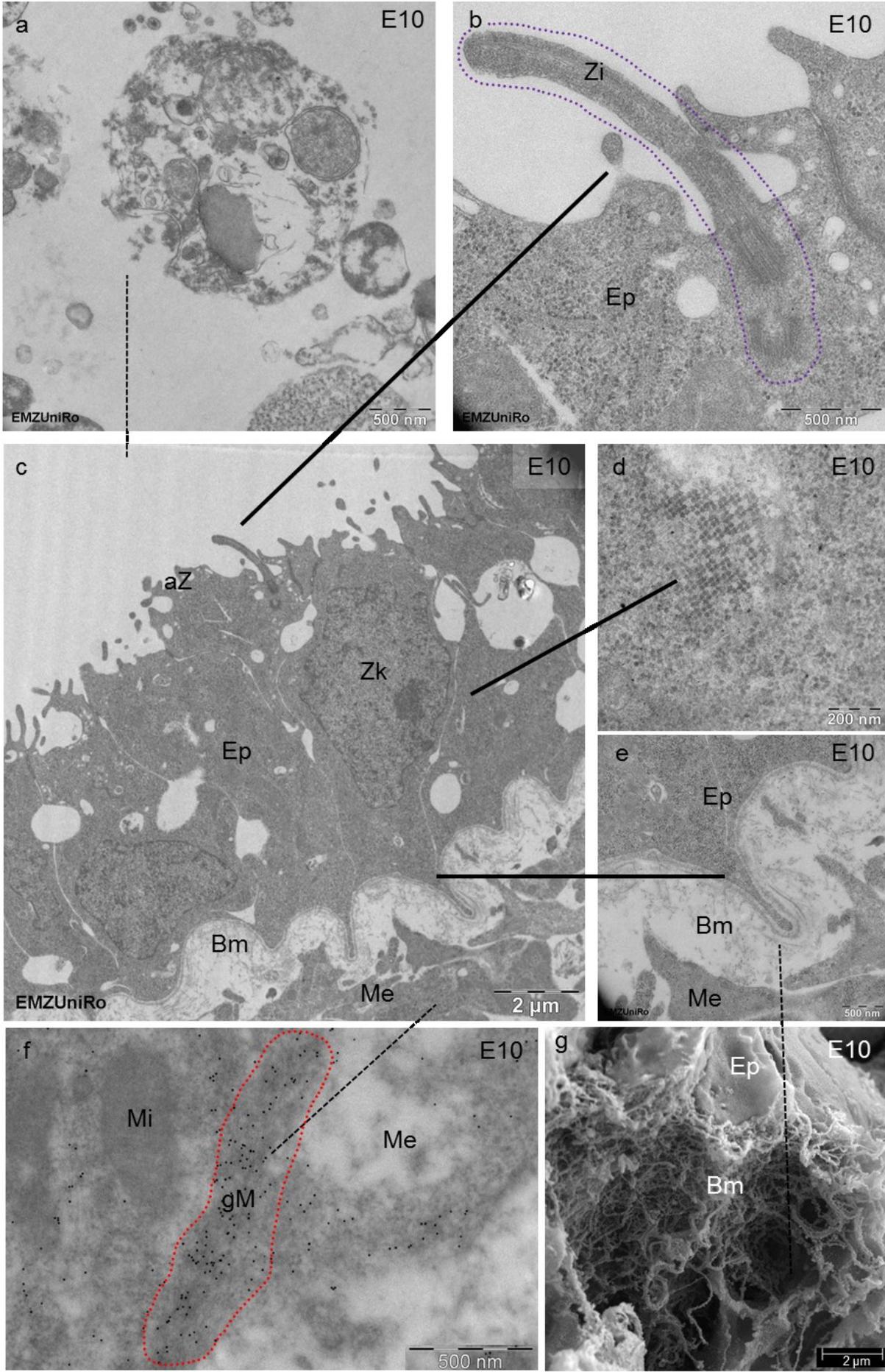
### 5.2.1 Der elektronenmikroskopische Aufbau im Entwicklungsstadium E10

Die im Entwicklungsstadium E10 ersichtlichen Bronchien sind, wie in der Literatur angegeben, als im Querschnitt kreisrund mit einschichtigem, hochprismatischen, bis kubischem Epithel (siehe Abb. 14a), das dem von Stadium E8 zu gleichen scheint. Die apikale Membran der Epithelzellen ist unregelmäßig geformt und hat lange, schmale, mikrovilliartige Ausläufer ins Lumen der Parabronchien (siehe Abb. 17c). Vereinzelt sind apikal im Epithel Zilien mit dazugehörigen Basalkörperchen und innenliegenden Mikrotubuli (siehe Abb. 17b). Zwischen den Epithelzellen sind große blasenartige Hohlräume, die teilweise mit einer kristallin anmutenden Substanz gefüllt sind. Im Zytoplasma des Epithels kamen kristalline Formationen von Zellbestandteilen vor (siehe Abb. 17d). Die Epithelzellen haben den typischen Aufbau eines embryonalen Epithels mit apikalen Haftkomplexen aus *Tight junctions*, *Adherens junctions* und *Maculae adhaerentes*, großen Zellkernen, Zellorganellen wie Mitochondrien und Golgi-Apparaten. Apikal finden sich viele kleinere Vesikel, die keinen elektronendichten Inhalt haben. Das hochprismatische Epithel bildet basal vereinzelt kleine spitze Ausläufer in Richtung des Mesenchyms (siehe Abb. 17c). Diese treten bei Parabronchien mit kleinerem Lumen seltener auf als bei Parabronchien mit größerem Lumen. Bei Querschnitten ohne Lumen, an den wachsenden Enden, waren diese basalen Epithelvorwölbungen nicht zu beobachten. Dieser Unterschied wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Basallamina erscheint durch die basalen Epithelvorwölbungen unregelmäßig gefaltet. Die *Lamina fibroreticularis* ist von unterschiedlicher Breite, an den basalen Vorwölbungen deutlich dünner. Während die *Lamina rara* und die *Lamina densa* in konstanter Dicke auftreten (siehe Abb. 17e). In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme sind die Filamente der *Lamina fibroreticularis* als dichtes Netz zu sehen (siehe Abb. 17g). Im Lumen der Parabronchien finden sich in allen untersuchten Entwicklungsstadien rundlich angeordnete Zelltrümmer, die noch erkennbare Zellorganellen enthalten (siehe Abb. 17a). Das Mesenchym ist um die Parabronchien im Stadium E10 dichter gepackt, je größer das Lumen umso dichter. Vereinzelt sind erste glattmuskuläre Anteile in

den langgestreckten Zellen ersichtlich (siehe Abb. 17f). Bei Parabronchien mit kleinem Lumen und lockerem parabronchialen Mesenchym sind solche glattmuskulären Strukturen nicht auffindbar. Die Mesenchymzellen im lockeren Mesenchymgewebe haben ein größeres Kern-Plasma-Verhältnis als die Epithelzellen. Ihr Zellkern liegt rund und mittig umgeben vom Zytoplasma. Die langausgezogenen Zellfortsätze verbinden die Mesenchymzellen untereinander.

**Abbildung 17 (gegenüber):** Übersicht über die Strukturen eines Parabronchus im Entwicklungsstadium E10 von apikal nach basal.

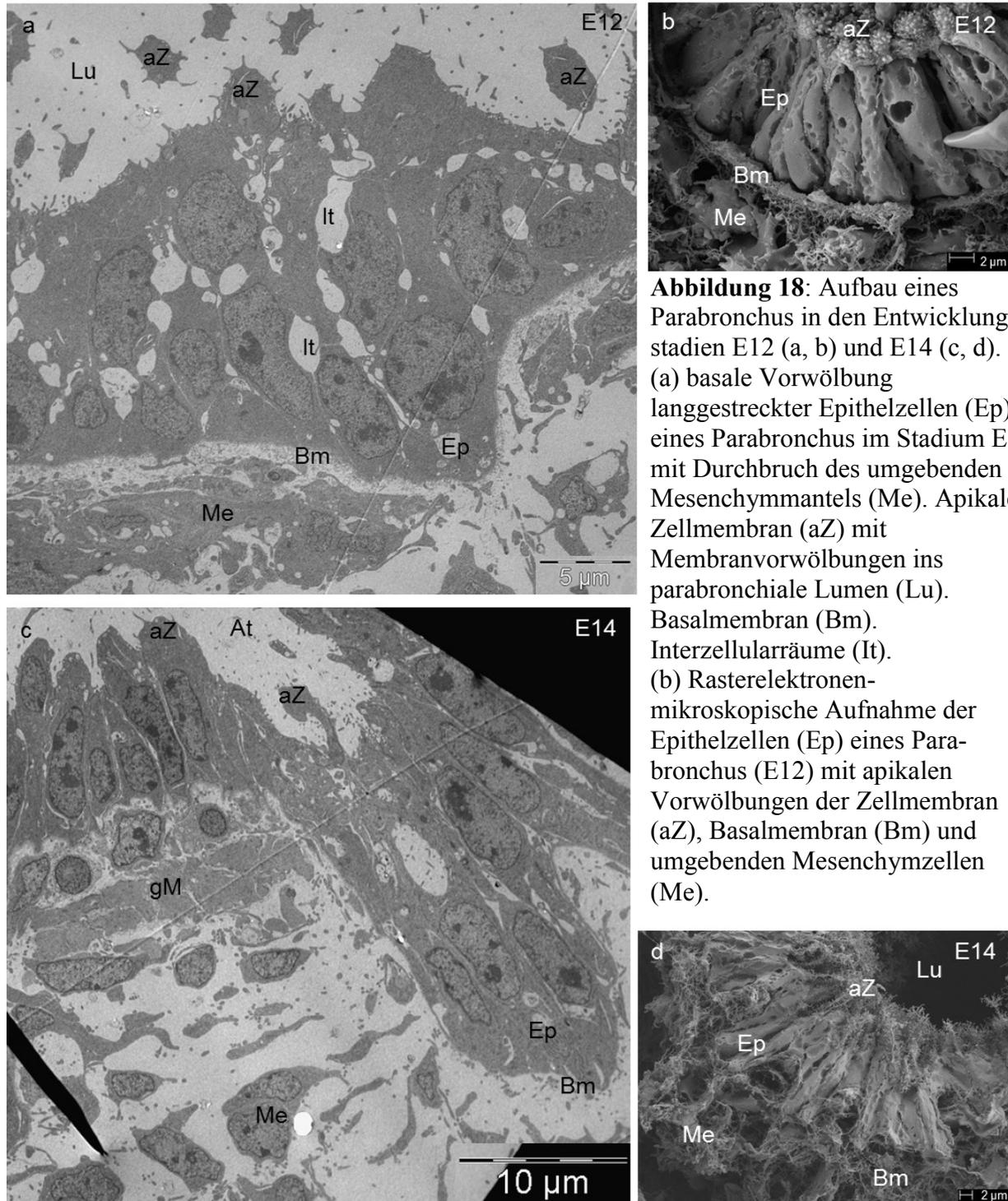
- (a) rundliche Zelltrümmer im Lumen des Parabronchus mit Resten von Zellorganellen.
- (b) Ausschnitt aus Abb.17c: Zilie (Zi, violett umrandet) an der apikalen Zellmembran des Epithels (Ep) mit innenliegenden Mikrotubuli und darunter gelegenen Basalkörperchen.
- (c) parabronchiales Epithel (Ep) mit apikaler Zellemembran (aZ) mit mikrovilliartigen Ausläufern ins parabronchiale Lumen, großem basal gelegenen Zellkern (Zk), Basalmembran (Bm) mit spitzen Vorwölbungen des Epithels und dadurch verschmälertes *Lamina fibroreticularis* und darunter um den Parabronchus dicht liegenden Mesenchymzellen (Me).
- (d) intrazelluläre kristalline Anordnung von Zellbestandteilen im Zytoplasma der Epithelzelle.
- (e) Ausschnitt aus Abb.17c: Ausläufer der Basalmembran (Bm) einer Epithelzelle (Ep), der durch Verschmälerung der *Lamina fibroreticularis* nah an die Mesenchymzelle (Me) reicht.
- (f) Mit Anti-*alpha – smooth muscle actin*-Immunogold markierte glattmuskuläre Filamente (gM, rot umrandet) in einer Mesenchymzelle (Me), welche unter der Basalmembran des Parabronchus liegt. Mitochondrium (Mi).
- (g) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Filamente der Basalmembran (Bm) einer Epithelzelle (Ep).



## 5.2.2 Der elektronenmikroskopische Aufbau in den Entwicklungsstadien

### E12 und E14

Im Entwicklungsstadium E12 wird das vormals eher glatte Epithel unregelmäßiger. Apikal sind zelluläre Vorwölbungen, mikrovilliartige Fortsätze und kolbenförmige Abschnürungen, die ebenfalls mit mikrovilliartigen Fortsätzen besetzt sind, in das Lumen sichtbar (siehe Abb. 18b). Das Epithel ist nun kubisch bis hochprismatisch und mehrreihig, die Zellkerne liegen überwiegend basal. In einigen Zellen sind größere Vesikel mit rundlichen intravesikulären Strukturen neben den Zellorganellen sichtbar. Zwischen den Zellen treten große blasenartige Hohlräume auf, welche teilweise mit kristalliner Substanz angefüllt sind. Apikal treten die Haftkomplexe zwischen den Epithelzellen deutlich hervor, im mittleren Bereich die *Adherens junctions*. Die Basalmembran als Grenze zwischen Epithel und Mesenchym umschließt das bronchiale Epithel. Die Basallamina aus *Lamina rara* und *Lamina densa* ist zum Epithel klarer und konstanter als die *Lamina fibroreticularis* zum Mesenchym abgegrenzt. Einzelne Zellfortsätze der Mesenchymzellen reichen durch die *Lamina fibroreticularis* näher an das Epithel als die Mehrheit der mesenchymalen Zellen. Im Entwicklungsstadium E12 wurden sehr vereinzelt direkte Kontakte zwischen Mesenchym- und Epithelzellen durch die Basalmembran hindurch beobachtet (siehe Abb. 23a und b S. 62). An diesen Stellen ist die sonst konstante und durchgängige *Lamina densa* durchbrochen und zwischen den Zellmembranen der Mesenchym- und Epithelzelle ist nur noch ein äußerst geringer Zwischenraum. Das lockere Mesenchym verdichtet sich im Entwicklungsstadium E12 deutlich um die Parabronchien. Die Zellen liegen bereits fischzugartig längs unter der Basalmembran um den Bronchus herum. Zwischen ihnen ist der Interzellularraum äußerst gering. Glatte Muskelanteile sind jetzt unverkennbar in einigen Zellen des „parabronchialen“ Mesenchyms. Diese Vorstufen der atrialen Muskelzellen enthalten, neben den Zellorganellen und dem zentral gelegenen Zellkern, noch reichlich Zytoplasma. Das im Entwicklungsstadium E10 annähernd glatte einschichtige Epithel wölbt sich im Stadium E12 breiter in das umgebende Mesenchym vor. Dabei durchbricht es teilweise den dichten Mantel an Mesenchym um den Parabronchus und beginnt die Atrien zu formen (siehe Abb. 18a). Das lockere Mesenchym wird aus den bereits im Entwicklungsstadium E10 beschriebenen Mesenchymzellen mit zentral gelegenem Zellkern und langen Zellfortsätzen, die durch den weiten Extrazellularraum reichen, gebildet.



**Abbildung 18:** Aufbau eines Parabronchus in den Entwicklungsstadien E12 (a, b) und E14 (c, d). (a) basale Vorwölbung langgestreckter Epithelzellen (Ep) eines Parabronchus im Stadium E12 mit Durchbruch des umgebenden Mesenchymmantels (Me). Apikale Zellmembran (aZ) mit Membranvorwölbungen ins parabronchiale Lumen (Lu). Basalmembran (Bm). Interzellularräume (It). (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Epithelzellen (Ep) eines Parabronchus (E12) mit apikalen Vorwölbungen der Zellmembran (aZ), Basalmembran (Bm) und umgebenden Mesenchymzellen (Me).

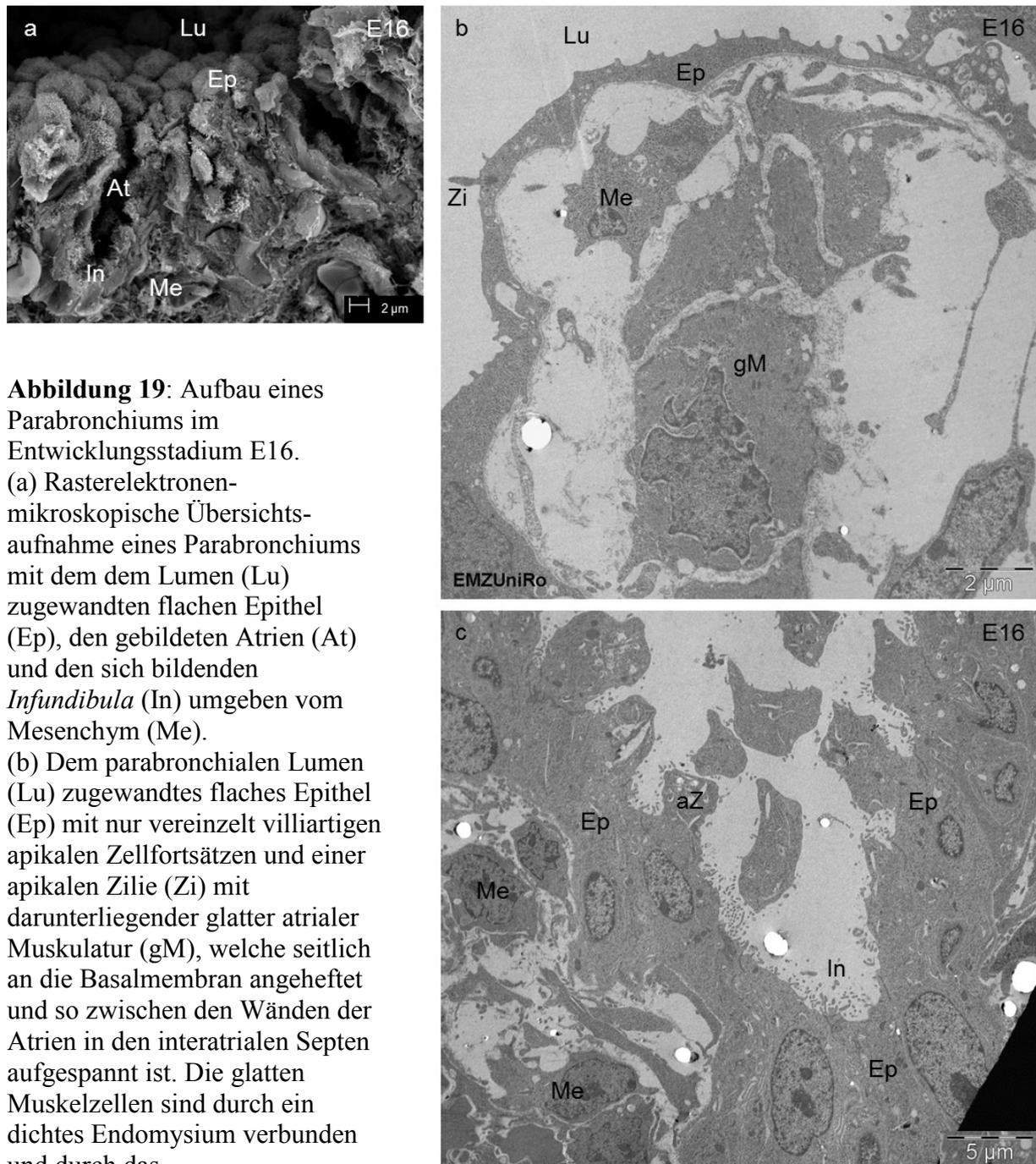
**Abbildung 18 (Fortsetzung):** (c) Langgestreckte Epithelzellen (Ep) eines Parabronchus im Stadium E14 bilden ein Atrium (At) mit seitlicher atrialer glatter Muskulatur (gM). Apikale Zellmembran (aZ) mit kleinen mikrovilliartigen und größeren kolbenförmigen Vorwölbungen ins parabronchiale Lumen. Basalmembran (Bm). Freie Mesenchymzelle (Me) ohne Kontakt zum Parabronchus.

(d) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Parabronchus (E14). An der apikalen Zellmembran (aZ) ragen verzweigte Zellausläufer der Epithelzellen (Ep) weit ins parabronchiale Lumen (Lu) vor. Basalmembran (Bm). Mesenchymzelle (Me).

Im Entwicklungsstadium E14 durchbricht das Epithel breit das umgebende Mesenchym und beginnt sich aufzuzweigen (siehe Abb. 18c). Die Atrien und *Infundibula* bilden sich. Das Epithel zum Lumen ist kubisch, in den Atrien und *Infundibula* ist es sehr langgestreckt hochprismatisch. Zwischen den Epithelzellen befinden sich blasenartige Hohlräume, teilweise mit kristallin anmutender Substanz gefüllt. Apikal ist das Zytoplasma ohne Organellen und bei einigen Zellen mit Vesikeln gefüllt. Die Haftkomplexe und *Adherens junctions* verbinden die Zellen seitlich. Die Zellorganellen, wie beispielweise Endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien, beschränken sich auf den mittleren bis basalen Bereich der Epithelzellen. Die Kerne liegen zumeist basal und lassen den typischen Zellkernaufbau mit Kernmembran, Hetero- und Euchromatin erkennen. Bei dem tiefer eingesunkenen Epithel sind apikal lange kolbenförmige und längliche Fortsätze, mit weiteren Zellausläufern besetzt, sichtbar (siehe Abb. 18d). Diese geben dem Epithel vom Lumen aus betrachtet ein Aussehen, das an dichten Pflanzenbewuchs erinnert. In den Schnittbildern sind im Lumen des Bronchus über dem Epithel viele kleine angeschnittene Zellfortsätze punktförmig verteilt. Die apikale Membran der „oberen“ Epithelzellen ist durch breite Vorwölbungen, besetzt und mit villiartigen Fortsätzen, ins Lumen gekennzeichnet. Basal umschließt die Basallamina das Epithel. Sie wirkt durch kleinere basale Vorwölbungen des Epithels wie gefaltet, ohne je übereinander zu liegen. Auch hier reichen einzelne Fortsätze der Mesenchymzellen durch die *Lamina fibroreticularis* deutlich näher an das Epithel heran. Die Epithelzellen haben basal keine solch langen Zellfortsätze. In der Abb. 23c (S.62) reicht eine Epithelzelle durch die Basallamina so dicht an eine Mesenchymzelle, dass sich ihre Zellmembranen berühren. Zwischen den Atrien liegen, wie aufgespannt, Verbände langgestreckter glatter Muskelzellen. Die Muskelzellen sind angefüllt mit Myofilamenten mit den typischen *Area densa*. Die Zellorganellen sind an den Rand der Muskelzellen gedrängt. Zwischen den glatten Muskelzellen und dem dem Lumen zugewandten Epithel liegen Mesenchymzellen, welche keine Anteile glatter Muskulatur haben und nicht die typische langgestreckte Zellform aufweisen. Ihre Zellkerne liegen mittig und sie haben eine rundliche Zellform. Vereinzelt befinden sie sich in Auflösung. Um die sich bildenden Atrien und *Infundibula* liegen nur vereinzelt Mesenchymzellen in der Nähe der Basalmembran. Die Mesenchymzellen, welche nicht in der Nähe des Bronchus liegen, sind in lockerem Zellverband mit langen Zellausläufern miteinander in Kontakt. Die großen Zellkerne füllen fast die gesamte Zelle aus.

### 5.2.3 Der elektronenmikroskopische Aufbau im Entwicklungsstadium E16 und der Blut-Luft-Schranke

Durch die starke Spezialisierung der Zellen und Gewebe ist das Bild im Entwicklungsstadium E16 deutlich unübersichtlicher (siehe Abb. 19a). Die dem Lumen zugewandten „oberen“ Epithelzellen sind flach ausgezogen, mit wenigen kurzen Zellfortsätzen. Sie wölben sich rund in das bronchiale Lumen vor (siehe Abb. 19b). Tiefer in den Atrien und *Infundibula* wird das Epithel hochprismatisch, mit langen Zellausläufern in Richtung Lumen (siehe Abb. 19c). Insgesamt sind diese Zellausläufer nicht so reichlich und lang wie im Entwicklungsstadium E14. Auch hier liegen die Zellkerne basal im hochprismatischen, „tiefer“ liegenden Epithel, beziehungsweise zentral im flachen, dem Lumen zugewandten Epithel. Zwischen den Epithelzellen treten blasenartige Hohlräume auf. Diese sind an den apikalen Haftkomplexen und den *Adherens junctions* nicht zu finden. Das Zytoplasma ist reichlich mit elektronendichtem Material, wie Ribosomen oder anderen Zellorganellen, angefüllt. Die dünne Basallamina umgibt das Epithel und es existiert kaum noch eine *Lamina fibroreticularis*. Sehr vereinzelt sind auch in diesem Stadium direkte Kontakte zwischen Epithel- und Mesenchymzellen durch die Basallamina zu beobachten. In Abb. 23d (S.62) hat eine Mesenchymzelle einen breiten fußförmigen Fortsatz unter der Basallamina. Die atriale Muskulatur ist in den zum Lumen gewandten atrialen Septen aufgespannt, mit nur noch vereinzelt nicht-glattmuskulären Mesenchymzellen unter dem Epithel (siehe Abb. 19b). Die fischzugartig liegenden glattmuskulären Zellen sind durch das Endomysium verbunden und vom Perimysium umgeben. Ihre gefalteten Zellkerne liegen zentral umgeben von dichten glattmuskulären Filamenten, welche je nach Ebene quer oder längs angeschnitten sind. Der Eingang in die Atrien ist verengt, die *Infundibula* und sich bildenden Luftkapillaren reichen weit ins Mesenchym vor und beginnen sich mit den nun reichlich vorhandenen Blutkapillaren anzunähern. Kapillare und Blutzellen finden sich bis unter die glatte Muskulatur, so dass das lockere Mesenchym noch ein schmaler Saum zwischen den interparabronchialen Septen und dem Gasaustauschgewebe ist. Die Kapillaren entspringen den Blutgefäßen, welche in den interparabronchialen Septen verlaufen. Sie bilden sich aus einem dünnen Endothel, welches von einer ebenfalls dünnen Basallamina umgeben ist und sind dicht angefüllt von roten Blutzellen. Diese Blutzellen sind länglich mit einem zentralen Zellkern aufgebaut. Im homogen erscheinenden Zytoplasma sind einzelne Zellorganellen zu finden.



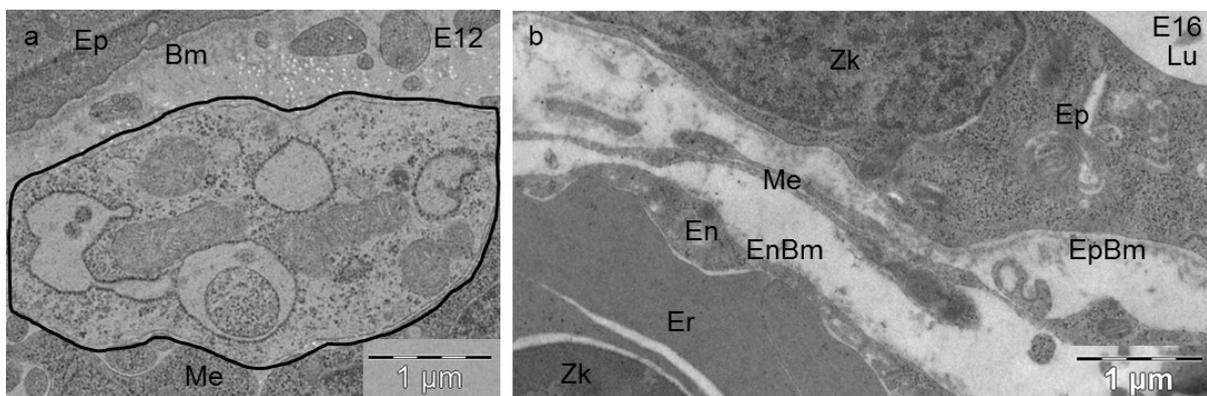
**Abbildung 19:** Aufbau eines Parabronchiums im Entwicklungsstadium E16.

(a) Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Parabronchiums mit dem dem Lumen (Lu) zugewandten flachen Epithel (Ep), den gebildeten Atrien (At) und den sich bildenden *Infundibula* (In) umgeben vom Mesenchym (Me).

(b) Dem parabronchialen Lumen (Lu) zugewandtes flaches Epithel (Ep) mit nur vereinzelt villiartigen apikalen Zellfortsätzen und einer apikalen Zilie (Zi) mit darunterliegender glatter atrialer Muskulatur (gM), welche seitlich an die Basalmembran angeheftet und so zwischen den Wänden der Atrien in den interatrialen Septen aufgespannt ist. Die glatten Muskelzellen sind durch ein dichtes Endomysium verbunden und durch das

Perimysium umgeben. So liegen sie in einem engen, festen Zellverband. Die zentralen Zellkerne sind gefaltet. Zwischen glatter Muskulatur und dem Lumen zugewandtem flachem Epithel liegen einzelne Mesenchymzellen (Me), die keine glattmuskulären Anteile enthalten. (c) Langgestrecktes parabronchiales Epithel (Ep) mit breiten apikalen Vorwölbungen (aZ) und reichlich mikrovilliartigen Zellfortsätzen der Zellmembran, das weit in das Mesenchym (Me) vorgedrungen ist und ein Infundibulum (In) bildet.

Die Blutkapillaren beginnen sich mit den Luftkapillaren zu verweben und das Gasaustauschgewebe mit der Blut-Luft-Schranke zu bilden. Zwischen den Basallaminae ist teilweise noch circa 0,5 Mikrometer Platz, in dem noch einzelne langgezogene Zellfortsätze von Mesenchymzellen vorhanden sein können (siehe Abb. 20b). Zwischen den Blutkapillaren und dem Epithel sind sich in Auflösung befindliche Mesenchymzellen, welche teilweise glattmuskuläre Anteile besitzen (siehe Abb. 20a). Solche sich auflösenden Mesenchymzellen sind ab dem Stadium E12 zu finden. Auch durch eine Abflachung der Basalmembran des Epithels von circa 1 bis 0,5 Mikrometer im Entwicklungsstadium E10 bis auf circa 0,2 Mikrometer im Stadium E16 auf Kosten der *Lamina reticularis* wird die zukünftige Blut-Luft-Schranke gebildet.



**Abbildung 20:** Aufbau der sich bildenden Blut-Luft-Schranke.

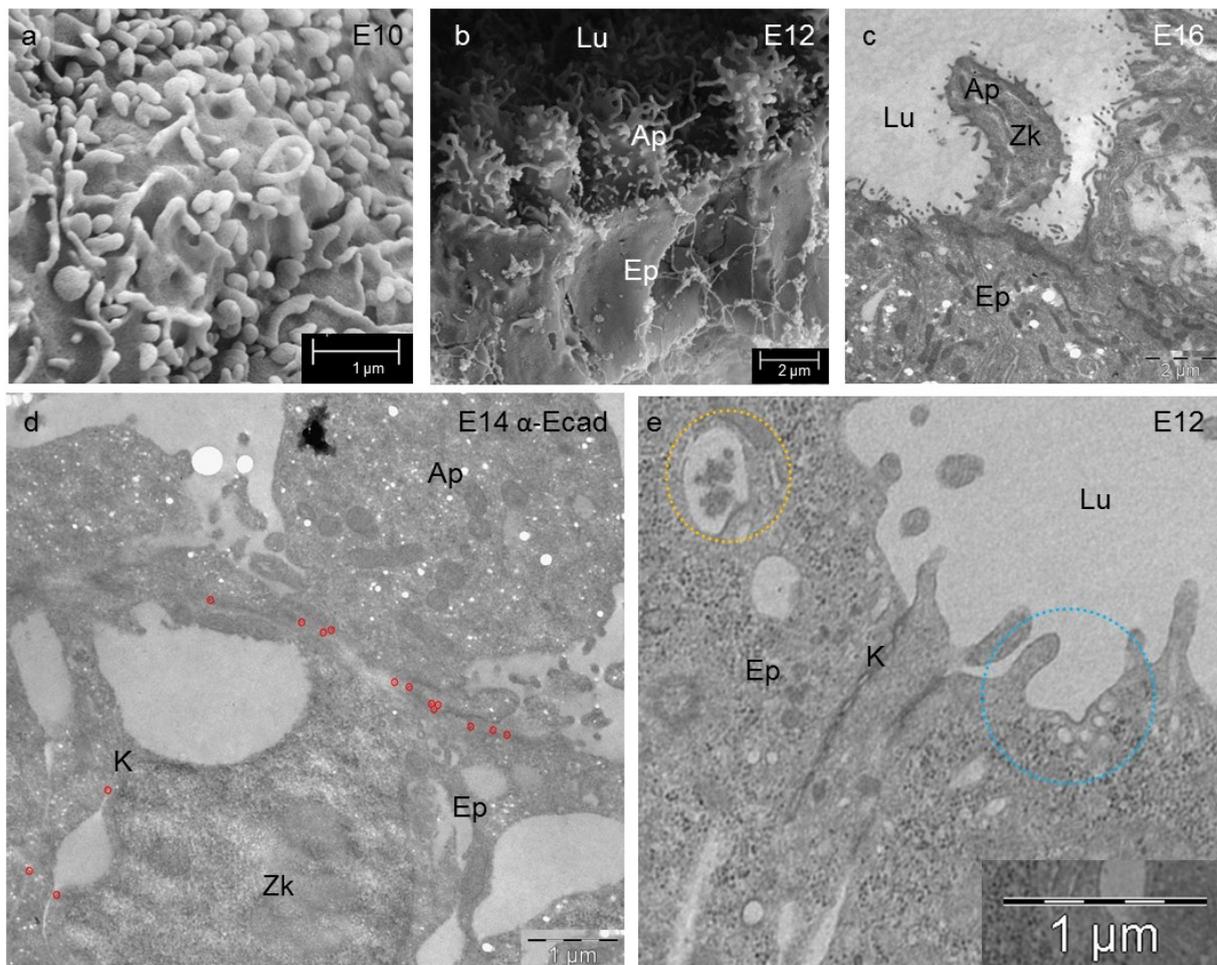
(a) Im Entwicklungsstadium E12 unter der Basalmembran (Bm) des Epithels (Ep) liegende Mesenchymzelle (schwarz umrandet), die sich in Auflösung befindet, darunter eine vitale Mesenchymzelle (Me).

(b) Die spätere Blut-Luft-Schranke im Stadium E16 wird gebildet durch das das parabronchiale Lumen (Lu) begrenzende Epithel (Ep) mit der epithelialen Basalmembran (EpBm) und dem Endothel (En) mit der endothelialen Basalmembran (EnBm). Dazwischen liegen noch Mesenchymzellen (Me) mit ihren langen Zellfortsätzen. In der Kapillare liegender Erythrozyt (Er) mit Zellkern (Zk). Epithel (Ep) mit Zellkern (Zk).

## 5.2.4 Die Transformation des Epithels und epithelial-mesenchymale

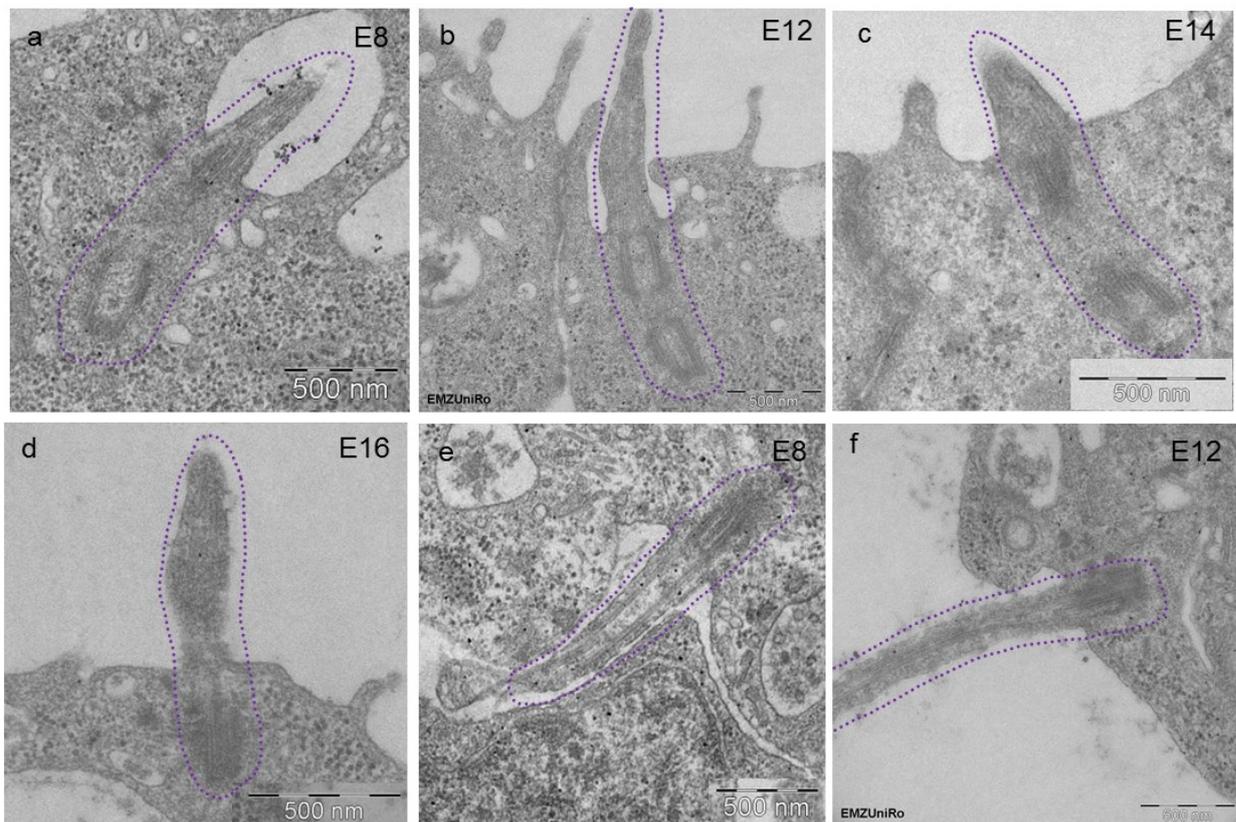
### Kontakte

In der Gegenüberstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen mit den Schnittbildern ist der Wandel der epithelialen Oberfläche zu beobachten. Im Entwicklungsstadium E10 bilden sich erste rundliche Abschnürungen (Aposomen) und villiartige Fortsätze (siehe Abb. 21a). Diese Ausstülpungen erreichen im Stadium E12 und E14 ihren Höhepunkt (siehe Abb. 21b). Besonders im Stadium E14 haben die apikalen Zellfortsätze ihre größte Länge erreicht (siehe Abb. 18d S. 53). Es werden Aposomen apikal vom Epithel abgeschnürt oder abgetrennt und ins Lumen des Parabronchus abgegeben. Vereinzelt liegen die Zellkerne im Epithel nicht wie üblich basal sondern apikal und die Zelle ist nur durch einen dünnen Ausläufer mit der Basallamina verbunden. Ab dem Stadium E16 wird die dem Lumen zugewandte Epitheloberfläche glatter (siehe Abb. 19b S. 56). Das zum Vergleich untersuchte Epithel der Trachea im Entwicklungsstadium E10 zeigt ähnliche Mikrovilli, aber keine Abschnürungen. Transmissionselektronenmikroskopisch sind diese Membranvorwölbungen ebenfalls zu erkennen. Teilweise sind sie mit einer Doppelmembran mit der darunter liegenden Zelle verbunden. Vereinzelt finden sich in diesen Fortsätzen Zellkerne (siehe Abb. 21c) und die verbindende Membran ist deutlich mit Anti-E-Cadherin markiert (siehe Abb. 21d). Zahlreiche teilweise gefüllte Vesikel sind in manchen Zellen apikal ersichtlich und fast alle Zellen haben apikale Mikrovilli (siehe Abb. 21e). Die kleinen Vesikel öffnen sich teilweise ins parabronchiale Lumen. Seitlich öffnen sich Vesikel in den Spalt zwischen den Epithelzellen (siehe Abb. 25a S. 66). In allen untersuchten Entwicklungsstadien sind zum Teil große Hohlräume im epithelialen Interzellularraum. Im parabronchialen Lumen sind, wenn durch die Präparation erhalten, in den Entwicklungsstadien E10 bis E16 in Auflösung befindliche Zelltrümmer ersichtlich (siehe Abb. 17a S. 51). Insgesamt flacht sich das Epithel der Parabronchien von den Stadien E10 und E12 bis E16 deutlich ab (siehe Abb. 14 S. 44).



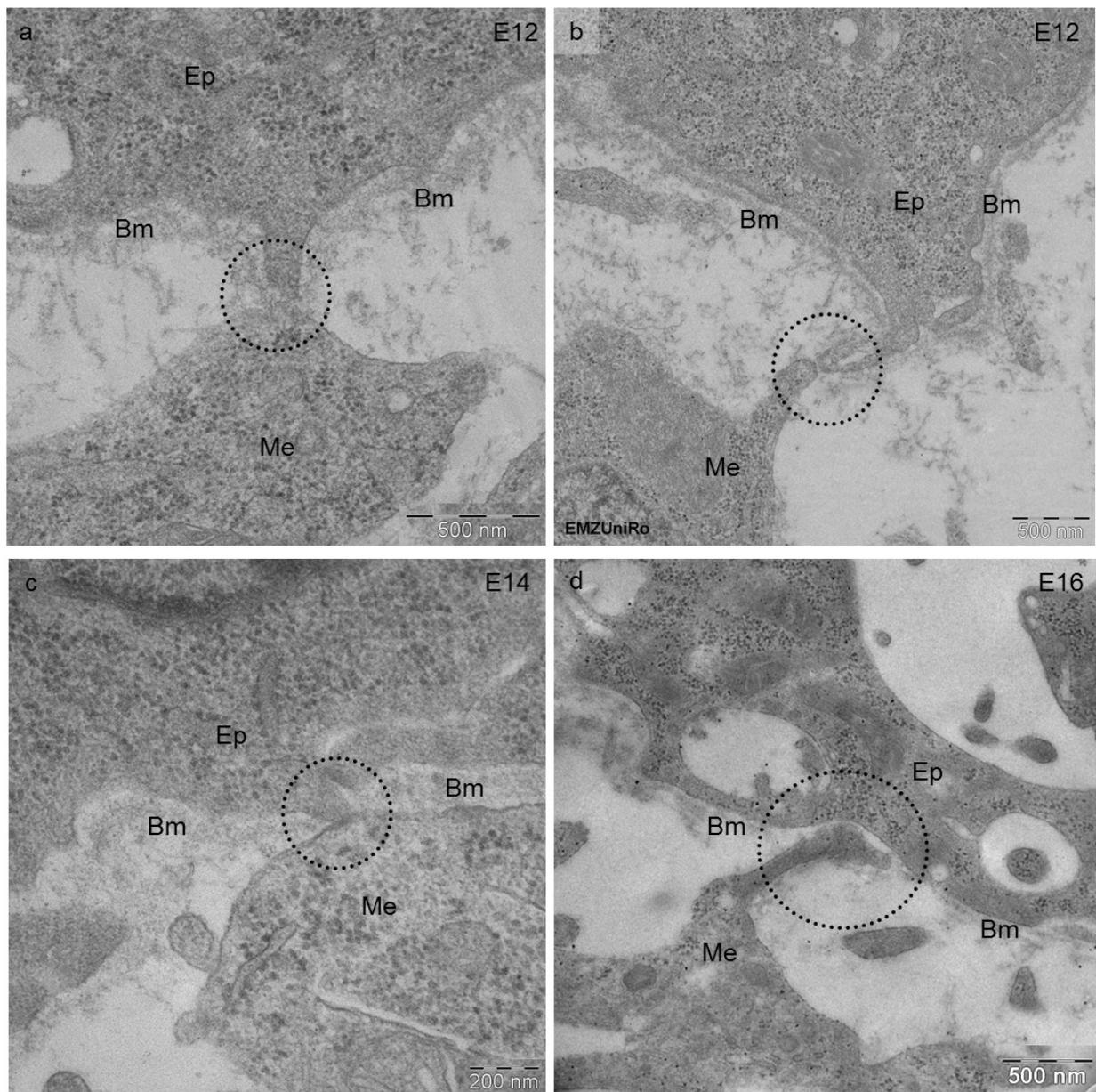
**Abbildung 21:** Umwandlungsvorgänge des Epithels der Parabronchien zur Bildung der Blut-Luft-Schranke: Apikale Abschnürung bei (a), (b), (c) und (d). Bildung von Vesikeln bei (e). (a) Rasterelektronenmikroskopische Aufsicht auf die apikale, dem parabronchialen Lumen zugewandte Zelloberfläche des Epithels mit villiartigen und kugelförmigen Vorwölbungen und Abschnürungen im Entwicklungsstadium E10. (b) Rasterelektronenmikroskopische Sicht auf das parabronchiale Epithel (Ep) des Entwicklungsstadiums E12, mit weit in das Lumen (Lu) ragenden Aposomen (Ap) welche selbst mikrovilliartige Fortsätze tragen. (c) Ein ins parabronchiale Lumen (Lu) ragendes Aposom (Ap) des Epithels (Ep) mit sichtbarem Zellkern (Zk) im Entwicklungsstadium E16. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme. (d) Immunogold-Anti-E-Cadherin(Ecad)-markierter apikaler Zellkontakt des Epithels (Ep) im Entwicklungsstadium E14. Rot markiert sind die gebundenen Goldkörner, welche E-Cadherin anzeigen. E-Cadherin befindet sich sowohl an den seitlichen Zellkontakten (K) (links im Bild) als auch an der Membran, die die Epithelzelle (Ep) mit dem Aposom (Ap) verbindet (Bildmitte). Zellkern (Zk). (e) Epithelzellen (Ep) des Entwicklungsstadiums E12. Gelb umrandet ist ein Vesikel mit sichtbarem Inhalt. Blau umrandet sind Vesikel, die sich ins Lumen (Lu) öffnen. Zellkontakte (K) verbinden die Epithelzellen seitlich. Nicht abgebildet sind die sich im parabronchialen Lumen befindlichen Zelltrümmer, welche in den Entwicklungsstadien E10 bis E16 gefunden wurden (siehe Abb. 17a S. 51).

In den Entwicklungsstadien E8 bis E16 wurden vereinzelte Zilien im Epithel gefunden, teilweise mit einem zweiten Centriol (siehe Abb. 22 a-d). Zweimalig, im Stadium E8 und E12 wurden Zilien im lockeren Mesenchym gesichtet (siehe Abb. 22 e, f). Von solchen singulären Zilien ist aus der Literatur über Hühnerlungen bisher nichts beschrieben. Diese Zilien sind von der Zellmembran umgeben und enthalten Mikrotubuli, basal finden sich ein, maximal zwei Basalkörperchen. Im Epithel sind sie stets ins Lumen gerichtet, im lockeren Mesenchym haben sie keine Ausrichtung.



**Abbildung 22:** Zilien in den embryonalen Epithel- und Mesenchymzellen der Hühnerlunge. Zilien (violett umrandet) im parabranchialen Epithel (a, b, c, d) in den Entwicklungsstadien E8 (a), E12 (b), E14 (c) und E16 (d) und im freien Mesenchym (e, f) in den Entwicklungsstadien E8 (e) und E12 (f). Zum Vergleich: Zilie im parabranchialen Epithel des Entwicklungsstadiums E10 siehe Abb. 17b (S.51). Erkennbar sind die längs ausgerichteten Mikrotubuli in der von der Zellmembran umgebenen Zilie. Basal liegt im Zytoplasma unter der Zilie ein Basalkörperchen, in Abb. 22b sogar ein zweites.

Vereinzelt kommt Epithel und Mesenchym in den Entwicklungsstadien E12 bis E16, einmalig beobachtet in E8, in so dichten Kontakt, dass dazwischen keine Basallamina liegt (siehe Abb. 23e). Dies wurde bisher in der Literatur über die Hühnerlunge noch nicht beschrieben. Häufiger wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass die Zellfortsätze der Mesenchymzellen durch die *Lamina fibroreticularis* bis an die Basallamina heran reichen (siehe Abb. 17e S. 51). An den Stellen an denen die Basallamina unterbrochen ist, wölben sich auch die Epithelzellen vor und treten in Kontakt mit den Mesenchymzellen (siehe Abb. 23c und Abb. 23d). Entweder liegt ein schmaler Spalt zwischen den Membranen der Zellen (siehe Abb. 23a, b) oder es berühren sich die Zellmembranen (siehe Abb. 23c). Es gibt eher punktförmige Kontakte (siehe Abb. 23b,c ) und Kontakte die einen größeren Membranbereich betreffen (siehe Abb. 23d,e ). In einem Fall sieht es so aus, als ob sich die Mesenchymzelle unter die Basallamina schiebt oder unter ihr hervorzieht (siehe Abb. 23e). Diese Beobachtungen können ein Hinweis auf das Vorkommen epithelial-mesenchymaler Transition in der embryonalen Hühnerlunge sein.



**Abbildung 23:** Kontakte zwischen Epithelzellen (Ep) und Mesenchymzellen (Me) teilweise durch die Basalmembran (Bm) hindurch als Hinweise auf eine epithelial-mesenchymale Transition in den Stadien E8 bis E16.

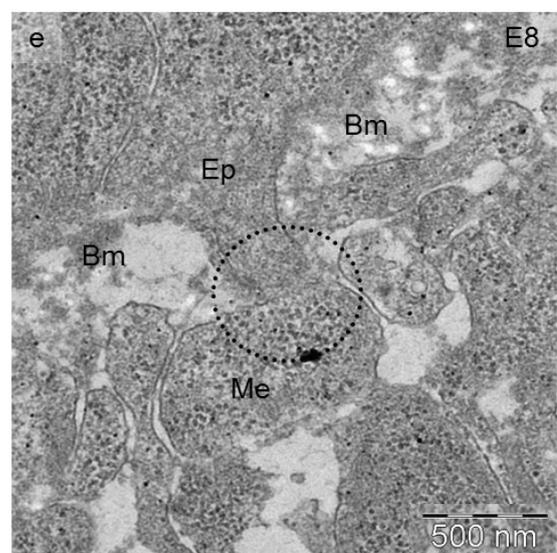
(a) Entwicklungsstadium E12. Die Basallamina (Bm) ist verschmälert, aber intakt. Epithel (Ep). Mesenchym (Me).

(b) Stadium 12. Kontakt zwischen Epithel (Ep) und Mesenchym (Me) durch die Basalmembran (Bm).

(c) Kontakt zwischen Epithel (Ep) und Mesenchym (Me) im Entwicklungsstadium E14. Basalmembran (Bm).

(d) Stadium E16. Die Mesenchymzelle (Me) hat breiten Kontakt zur Epithelzelle (Ep) durch die Basalmembran (Bm) hindurch.

(e) Entwicklungsstadium E8 mit starker Annäherung zwischen Epithel (Ep) und Mesenchym (Me) bei noch intakter Basallamina (Bm).



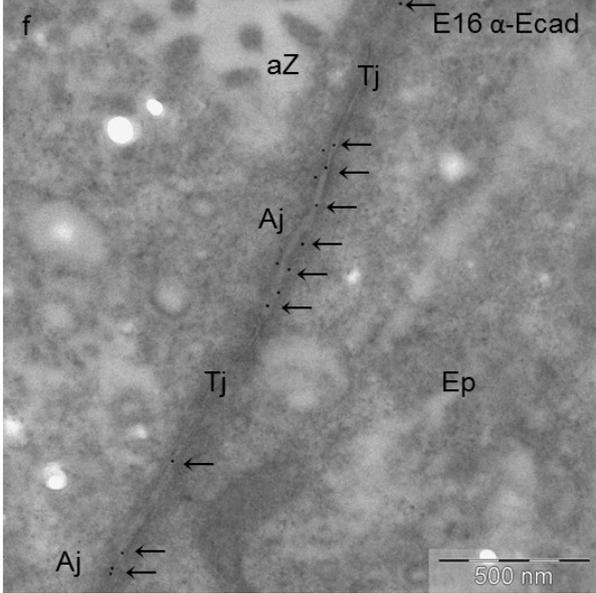
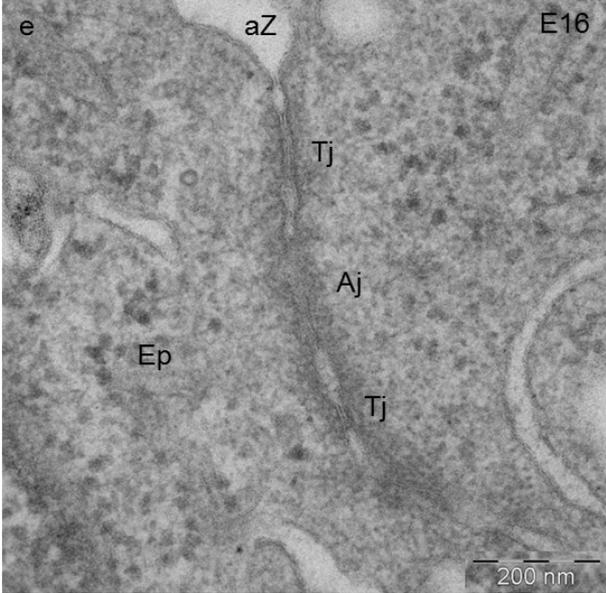
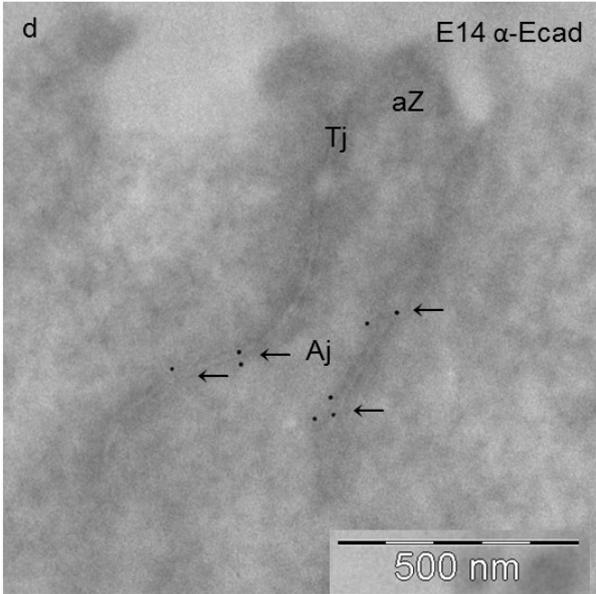
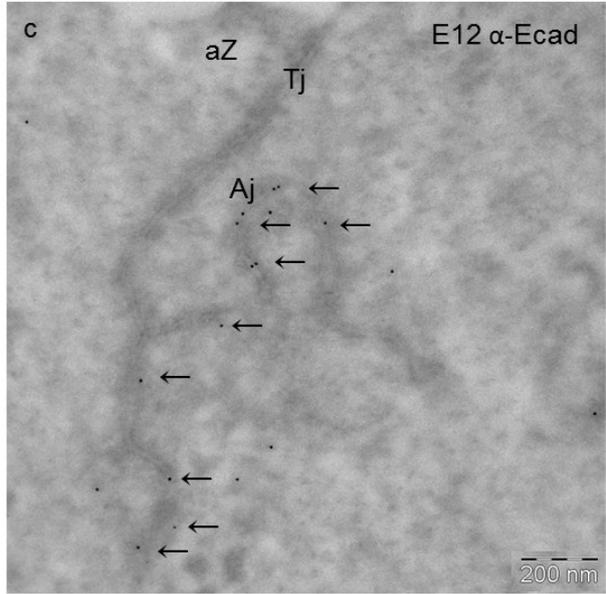
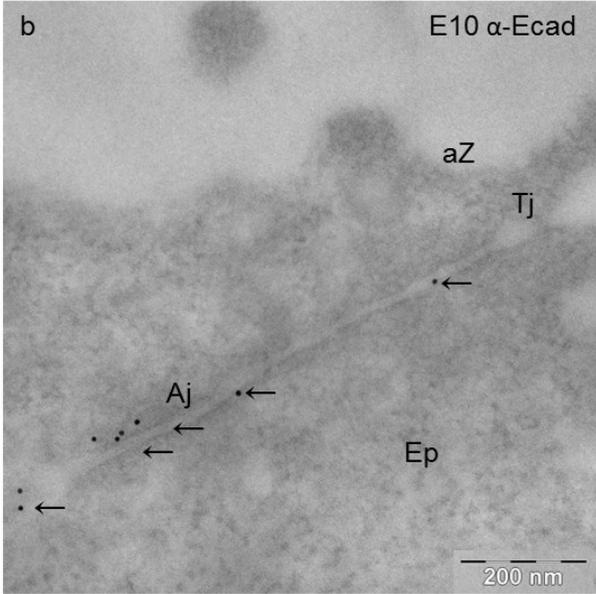
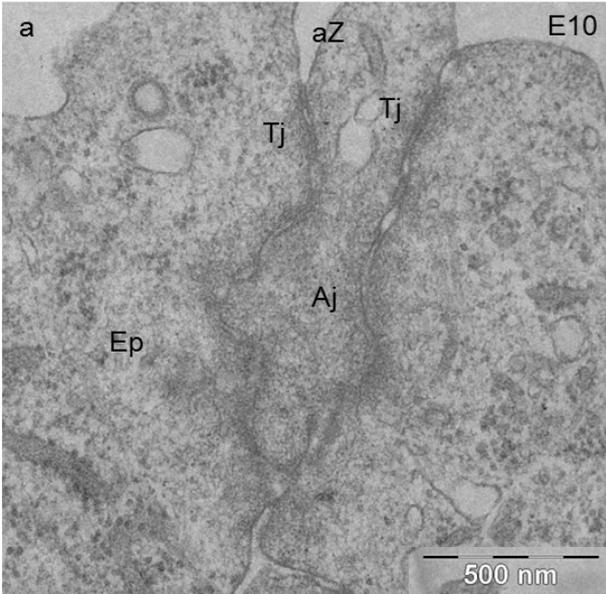
## 5.3 Die Immunmarkierungen

Um funktionelle Zusammenhänge in der Epithel-Mesenchym-Interaktion besser darzustellen, wurden die Zellbestandteile E-Cadherin, Transkriptionsfaktor SOX2, glattmuskuläres Aktin und Laminin mittels Immunogoldlabeling durch Antikörper im Transmissionselektronenmikroskop sichtbar gemacht. Es gelang für alle vier Antikörper Protokolle für die Durchführung der Markierung in den untersuchten Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16 zu entwickeln. Das Protokoll Nr. 26 Immunogoldstaining Anti-E-Cadherin (siehe Anhang S. XXXIX) und das Protokoll Nr. 27 Immunogoldstaining Anti-SOX2 (siehe Anhang S. XL) funktionierten ohne Probleme. Das Immunogoldlabeling mit dem Anti-*alpha – smooth muscle actin* -Antikörper brachte mit einer Verdünnung des Antikörpers von 1:1000 und der Zugabe von 1% Perfect-Block™ zum Blocking-Puffer gute Ergebnisse (Protokoll Nr. 28 S. XL) Die Markierung mit Anti-Laminin war spezifisch, aber insgesamt schwach ausgeprägt, trotz hoher Dosierung des primären Antikörpers (Protokoll Nr. 29 S. XLI).

### 5.3.1 Die Markierung mit Anti-E-Cadherin-Antikörpern

Bei der Immunmarkierung mit Anti-E-Cadherin-Antikörpern wurde bei allen untersuchten Entwicklungsstadien das Gold hauptsächlich auf den apikalen Haftkomplexen gefunden (siehe Abb. 24 b). In den ultrastrukturellen Untersuchungen sind in den untersuchten Entwicklungsstadien von E10 bis E16 die apikalen Schlussleisten mit *Tight junctions* und *Adherens junctions* erkennbar (siehe Abb. 24 a, e). Diese veränderten im Laufe des untersuchten Entwicklungszeitraums nicht ihren strukturellen Aufbau.

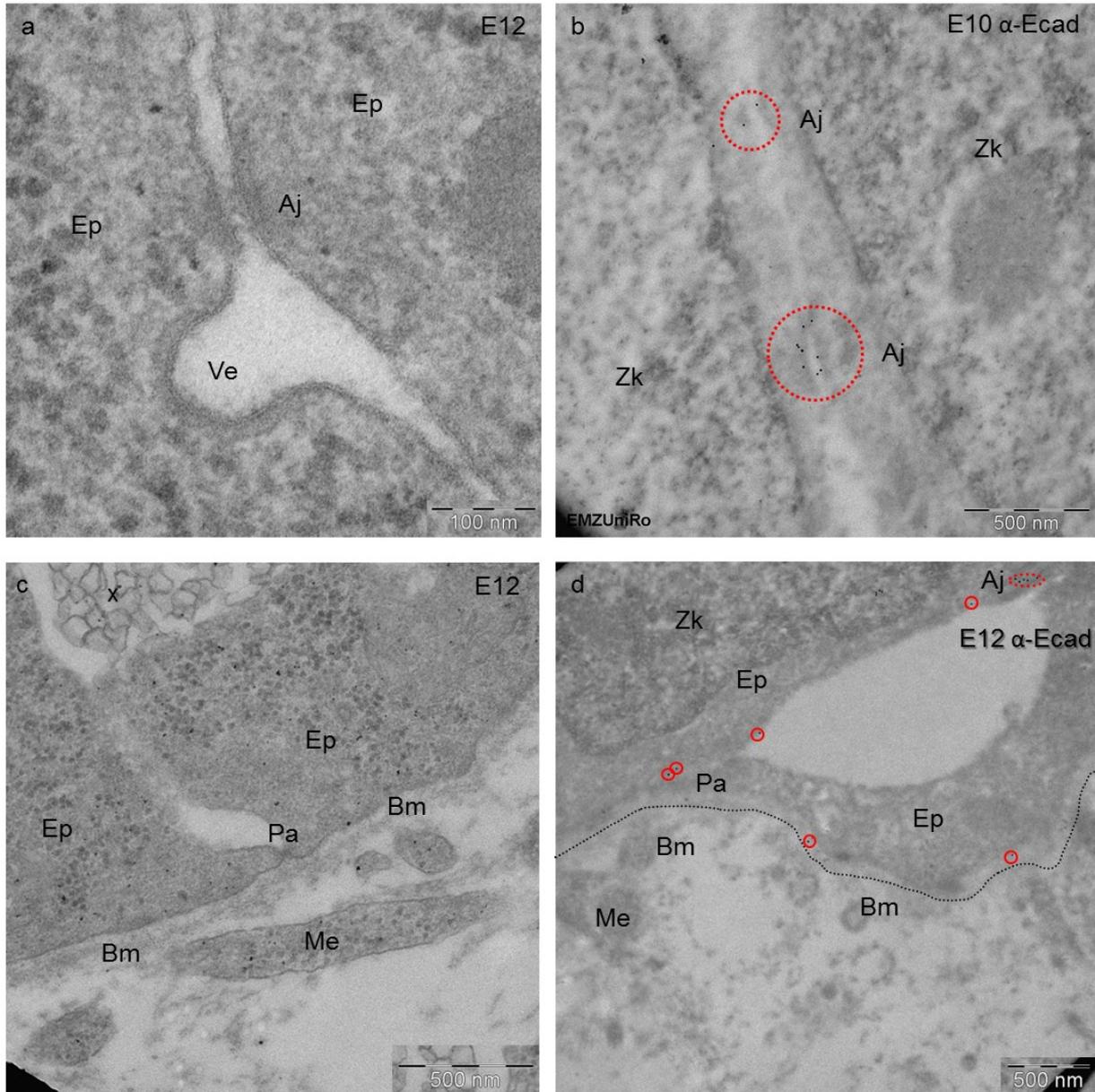
Apikal waren die Epithelzellen stets zuerst durch eine oder mehrere *Tight junctions* verbunden. Darauf folgten in basaler Richtung *Adherens junctions*, welche sich teilweise mit einzelnen *Tight junctions* abwechselten. Weil sich die apikale Zellmembran ins parabronchiale Lumen vorwölbte, wirkten die apikalen Haftkomplexe trichterförmig eingesunken. An den apikalen Haftkomplexen des Epithels markieren Anti-E-Cadherin-Antikörper spezifisch die *Adherens junctions* (siehe Abb. 24c). Wobei das kolloidale Gold häufiger auf den elektronendichten Haftplatten als im helleren Zellzwischenraum auftritt. Nie wurde Gold ganz apikal an den Zellkontakten oder der apikalen Zellmembran gesehen (siehe Abb. 24d).



**Abbildung 24 (gegenüber):** Apikale Zellkontakte des Epithels im Vergleich Struktur (a, e) und Anti-E-Cadherin(Ecad)-Markierung (b, c, d, f).

- (a) Apikale Zellmembran (aZ) des Epithels (Ep) im Stadium E10 mit *Adherens junctions* (Aj) und *Tight junctions* (Tj). Nicht markierte Aufnahme vom Epon-Ultradünnschnitt.
- (b) Apikale Zellmembran (aZ) im Stadium E10 mit Anti-E-Cadherin-Immunogold (Pfeile) markierten *Adherens junctions* (Aj), die *Tight junctions* (Tj) sind nicht markiert. Epithel (Ep).
- (c) Im Entwicklungsstadium E12 markiertes E-Cadherin (Pfeile). Apikale Zellmembran (aZ), *Adherens junction* (Aj), *Tight junction* (Tj).
- (d) E-Cadherin (Pfeile) der *Adherens junctions* (Aj) markiert im Stadium E14. Apikale Zellmembran (aZ), *Tight junction* (Tj).
- (e) Apikale Zellmembran (aZ) des Epithels (Ep) im Stadium E16 mit *Tight junctions* (Tj) und *Adherens junctions* (Aj). Nicht markierte Aufnahme vom Epon-Ultradünnschnitt.
- (f) Apikale Zellmembran (aZ) im Stadium E16 mit Anti-E-Cadherin-Immunogold (Pfeile) markierten *Adherens junctions* (Aj) und nicht markierten *Tight junctions* (Tj). Epithel (Ep).

Auf den *Tight junctions* wurde nur vereinzelt Gold gefunden. Seitlich unter den apikalen Haftkomplexen sind die Epithelzellen durch Interdigitationen und *Adherens junctions* miteinander verbunden, Vesikel öffnen sich in den Interzellularraum (siehe Abb. 25 a). Diese seitlichen *Adherens junctions* sind ebenfalls spezifisch markiert und somit identifizierbar (siehe Abb. 25 b). Sowohl in den ultrastrukturellen Bildern als auch in den funktionellen Abbildungen ist der unterschiedliche Aufbau der Zellkontakte ersichtlich. Die für *Adherens junctions* charakteristischen intrazellulären Haftplatten heben sich als elektronendichte Strukturen hervor. Um die *Adherens junctions* herum ist das Zytoplasma verdichtet. Der Interzellularspalt zwischen den Epithelzellen ist hier deutlich breiter als bei den *Tight junctions* und von konstanter Breite. Während der Interzellularraum an Stellen ohne Zellkontakten hohen Schwankungen unterlegen ist. Die *Tight junctions* sind unverwechselbar durch die miteinander verschmolzenen Zellmembranen charakterisiert. Der sichtbare elektronendichte Streifen zwischen den Zellen bezeichnet die verschmolzenen elektronendichten äußeren Schichten der Doppelmembranen. An diesen Orten ist der Abstand zwischen den Epithelzellen besonders gering. Intrazellular ist das Zytoplasma um die *Tight junctions* ebenfalls verdichtet. Basal verbindet eine punktförmige Zellkontaktstelle *Punctum adhaerens* benachbarte Epithelzellen über der Basalmembran miteinander (siehe Abb. 25 c). An den *Puncta adhaerentes* über der Basallamina sah man eine schwächere Markierung (siehe Abb. 25 d). Zwischen den Entwicklungsstadien E10 bis E16 fand sich kein Unterschied in der Spezifität der Markierung, sowohl auf den apikalen als auch den seitlichen Zellkontakten. Auch auf den Zellkernen und im Zytoplasma wurde vereinzelt Gold gefunden. Sehr gering war das basale Plasmalemm markiert (siehe Abb. 25 d), ebenso die glatten Muskelzellen und ihr Zellzwischenraum.



**Abbildung 25:** Strukturelle (a, c) und Anti-E-Cadherin(Ecad)-markierte Aufnahmen (b, d) von Zellkontaktstellen im Vergleich.

(a) Interzelluläre *Adhärens junction* (Aj) zweier Epithelzellen (Ep) im Entwicklungsstadium E12. Darunter sich in den Interzellularraum öffnendes Vesikel (Ve). Epon-Ultradünnschnitt ohne Markierung.

(b) Mit Anti-E-Cadherin-Immungold (rote Umrandung) markierte *Adhärens junctions* (Aj) zwischen zwei Epithelzellen mit Zellkernen (Zk) im Entwicklungsstadium E10.

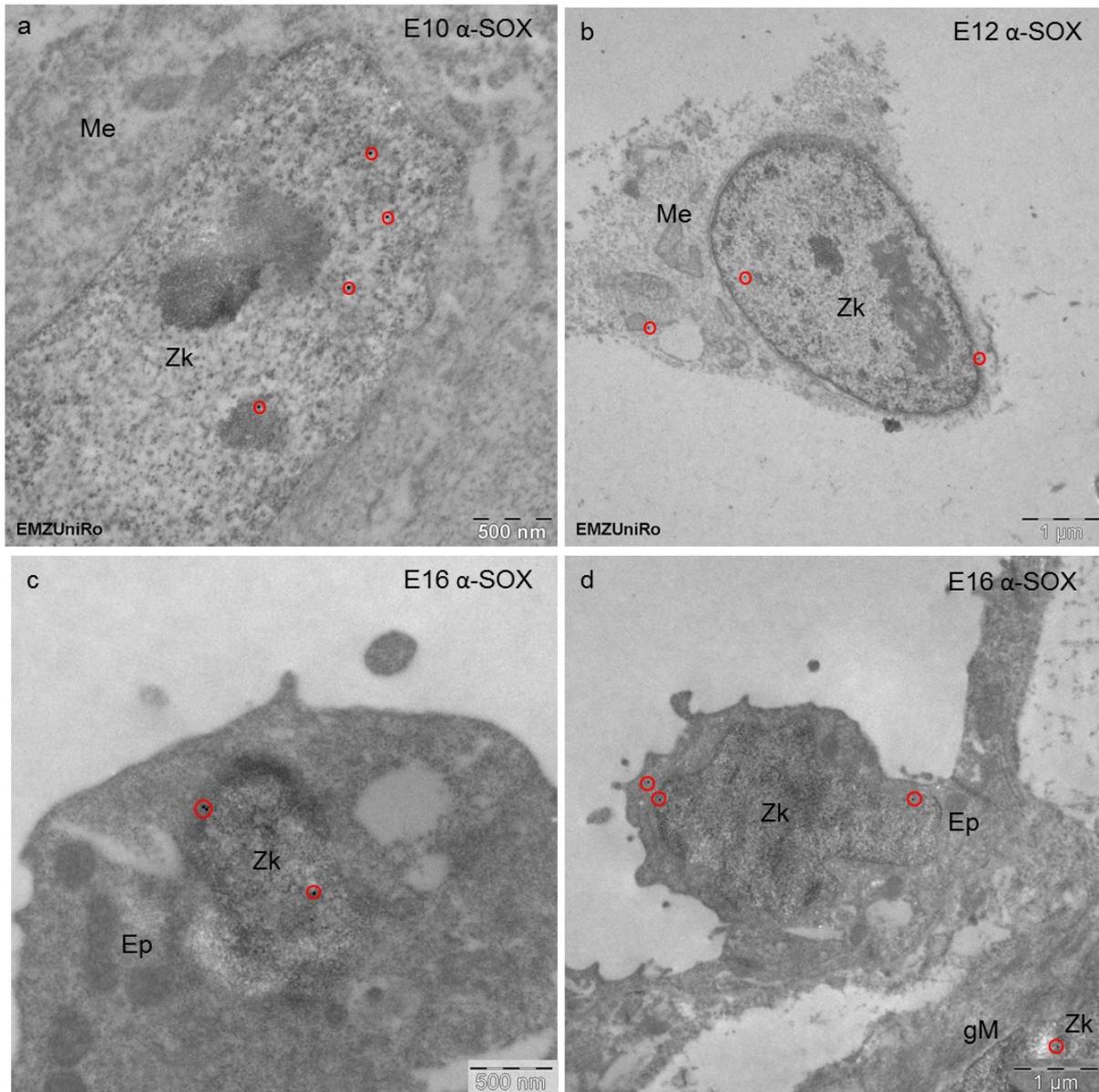
(c) Basales *Punctum adhaerens* (Pa) zweier Epithelzellen (Ep) über der Basalmembran (Bm) im Stadium E12. Mesenchymzelle (Me). Kristallin anmutende Substanz im Interzellularraum (x). Epon-Ultradünnschnitt ohne Markierung.

(d) Mit Anti-E-Cadherin markiertes (rote Umrandung) basales *Punctum adhaerens* (Pa) über der Basalmembran (Bm, schwarze Linie) und *Adhärens junction* (Aj) zweier Epithelzellen (Ep). Mesenchymzelle (Me). Zellkern (Zk).

### 5.3.2 Die Markierung mit Anti-SOX2-Antikörpern

Bei der Immunmarkierung mit Anti-SOX2-Antikörpern fand sich das Gold spezifisch auf den Zellkernen, auch auf der Kernmembran, seltener auf den Nucleoli (siehe Abb. 26 a). Ebenfalls im Zytoplasma wurde das kolloidale Gold sowohl bei epithelialen als auch bei mesenchymalen Zellen vereinzelt gesehen (siehe Abb. 26 b, d). Es wurden sowohl epitheliale (siehe Abb. 26 a) als auch mesenchymale Zellen (siehe Abb. 26 b) bei den untersuchten Entwicklungsstadien E10 bis E16 spezifisch markiert. Bei den mesenchymalen Zellen wurde das kolloidale Gold auf den Zellkernen von Zellen im lockeren Mesenchym (siehe Abb. 26 b) genauso wie auf den sich bildenden glatten Muskelzellen (siehe Abb. 26 d) gesichtet. In den strukturellen Aufnahmen waren die Zellkerne stets in ihrem typischen Aufbau, mit innerer und äußerer Kernmembran, Kernporen, Nucleoli und Eu- sowie Heterochromatin ersichtlich. Die Nucleoli lagen in ihrer Elektronendichte zwischen dem elektronendichten Heterochromatin und dem weniger elektronendichten Euchromatin und hatten nicht solch eine granuläre Binnenstruktur wie das Chromatin, sondern eine eher homogene Struktur (siehe Abb. 26 a).

Das Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometer konnte ermittelt und absolute wie relative Werte der arithmetischen Mittelwerte berechnet werden. Durch die Auszählung der Goldkörner pro Kernfläche fiel ein großer Unterschied in der Markierungsdichte sowohl zwischen den Präparaten als auch auf einem Präparat auf. In den Entwicklungsstadien E10 und E12 wurden die Zellen in „freies“, entspricht dem lockeren Mesenchym, „parabronchiales“, das heißt dem Epithel anliegendes Mesenchym und Epithel unterschieden. In den Entwicklungsstadien E14 und E16 wurde das Mesenchym in „freies“ und „parabronchiales“ Mesenchym, sowie glatte Muskulatur unterschieden und das Epithel in „oberes“, dem Lumen zugewandtes und „tiefes“, die Atrien und *Infundibula* bildendes Epithel aufgeteilt. Es wurde aufgrund der großen Streubreite der Daten und des geringen Datensatzes auf eine ausführlichere statistische Darstellung verzichtet. Eine Tabelle sowie Diagramme mit der Charakterisierung der Messwerte, wie arithmetischer Mittelwert, die Standardabweichung und der Median befindet sich im Anhang (Anhang S. XLIV). Dort ist in einem Boxplot (Anhang S. XLV) die Streubreite der einzelnen Zellarten in den verschiedenen Entwicklungsstadien ersichtlich. Ein Diagramm (Anhang S. XLVI) stellt den arithmetischen Mittelwert mit der großen Standardabweichung dar. In weitere Graphen im Anhang sind die absoluten und relativen Werte der Anti-SOX2-Immunogoldkörnern pro Kernfläche in den einzelnen Zellarten und Entwicklungsstadien aufgezeigt (Anhang S. XLVII und XLVIII). Die prozentualen Werte werden im Diagramm 1 (S. 69) zusammengefasst.



**Abbildung 26:** Mit Anti-SOX2(SOX)-Immunogold (rote Kreise) markierte Epithel- und Mesenchymzellen der Entwicklungsstadien E10, E12 und E16.

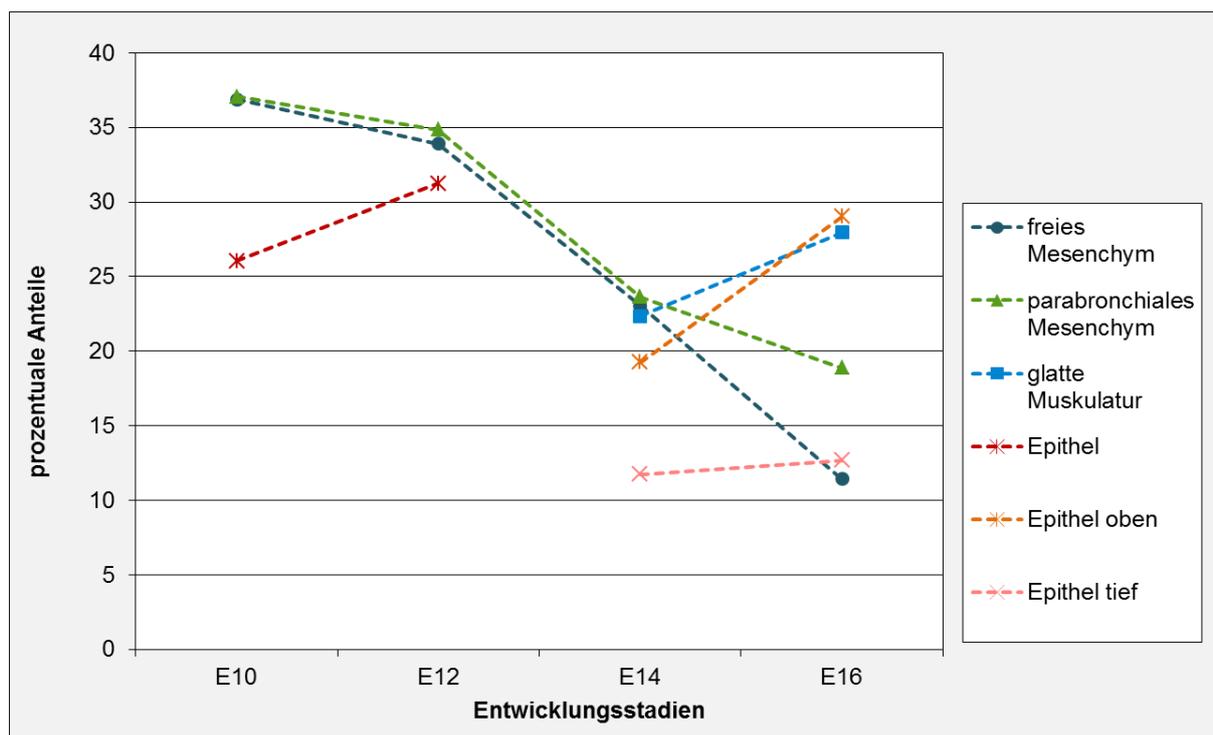
(a) Dem parabronchialen Epithel angelagerte „parabronchiale“ Mesenchymzelle (Me) des Stadiums E10 mit auf dem Zellkern (Zk) gebundenen Anti-SOX2-Immunogold-Antikörpern (rote Kreise).

(b) Freie Mesenchymzelle (Me) des Entwicklungsstadiums E12 ohne Kontakt zu einem Parabronchus. Anti-SOX2 (rote Kreise) befindet sich sowohl auf dem Zellkern (Zk) beziehungsweise auf der Kernmembran als auch im Zytoplasma.

(c) Dem parabronchialen Lumen zugewandte „obere“ Epithelzelle (Ep) des Entwicklungsstadiums E16 mit auf dem Zellkern (Zk) liegendem Anti-SOX2-Immunogold (rote Kreise).

(d) Im Stadium E16 mit Anti-SOX2 (rote Kreise) markierte dem parabronchialen Lumen zugewandte „obere“ Epithelzelle (Ep) und darunter liegende glattmuskuläre Mesenchymzelle (gM). Zellkern (Zk).

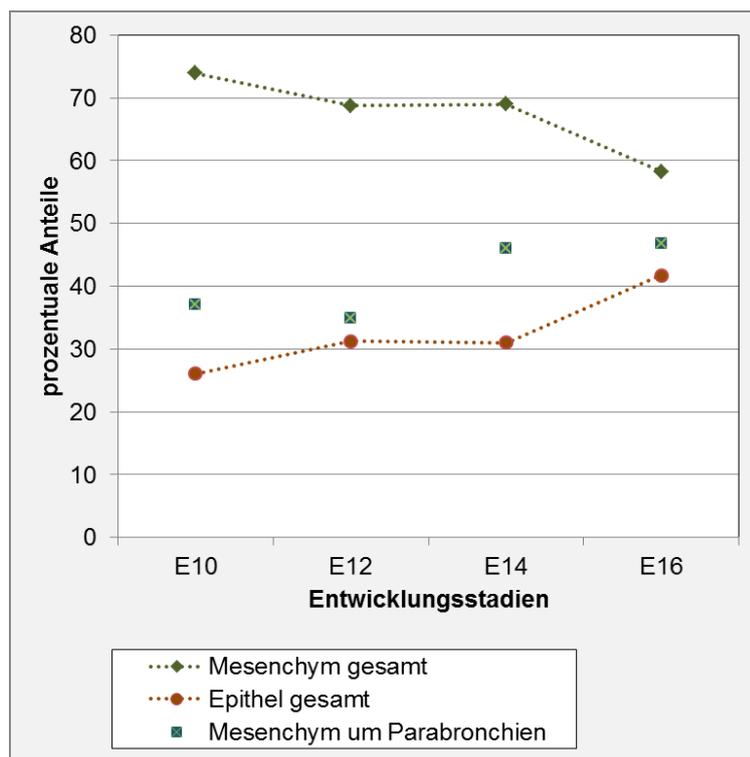
Das Gold pro Fläche auf den „freien“ Mesenchymzellen, welche nicht an einen Parabronchus angelagert sind, nimmt absolut vom Stadium E10 zu E12 ab und bis zu E16 wieder leicht zu. In Relation gesetzt nimmt es über den gesamten untersuchten Entwicklungszeitraum ab. Ähnlich verhält sich das Gold pro Fläche auf den „parabronchialen“ Mesenchymzellen, nur dass es absolut bis zum Stadium E16 stärker wieder ansteigt und in den relativen Werten insgesamt weniger stark sinkt. Bei den glattmuskulären Zellen nimmt das Gold pro Fläche sowohl in den absoluten als auch in den relativen Werten vom Stadium E14 bis E16 deutlich zu. Vom Stadium E10 bis E12 nimmt das Gold pro Fläche der Epithelzellen absolut ab, aber relativ zu. Zwischen E12 und E14 nimmt sowohl in den relativen als auch absoluten Werten das Gold pro Fläche in dem „oberen“ Epithel und dem „tiefen“ Epithel zu. Wobei das Gold pro Fläche relativ im dem „oberen“ Epithel deutlich zunimmt, während es bei dem „tiefen“ Epithel kaum mehr wird (siehe Diagramm 1).



**Diagramm 1:** Prozentualer Anteil der Anti-SOX2-Immunogoldkörnern auf den Zellkernen der verschiedenen Zellarten („freies“ Mesenchym, „parabronchiales“ Mesenchym, glatte Muskulatur, Epithel, Epithel „oben“ und Epithel „tief“) der Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16. Beschreibung siehe Text.

Anmerkung: Die Berechnung der relativen Werte erfolgte über die arithmetischen Mittelwerte, welche über die Rohwerte berechnet wurden. Die Tabelle und Diagramme mit den Charakteristika der Messwerte befindet sich im Anhang S. XLIV. Aufgrund der großen Streubreite der Daten und des geringen Datensatzes erfolgte keine ausführlichere statistische Analyse und Darstellung.

Insgesamt nehmen alle absoluten arithmetischen Mittelwerte der Markierungsdichte zwischen den Stadien E10 zu E12 ab und zwischen E14 und E16 zu. Wenn wir alle relativen Werte der Mesenchymzellen und der Epithelzellen zusammennehmen, sinkt das Gold pro Fläche im Mesenchym und steigt im Epithel in den untersuchten Entwicklungsstadien E10 bis E16 (siehe Diagramm 2). Wenn die relativen Werte der Markierungsdichte des parabronchialen Mesenchyms und der glatten Muskelzellen als „Mesenchym um die Parabronchien“ zusammengezählt werden steigen sie im beobachteten Entwicklungszeitraum von E10 bis E16 an (siehe Diagramm 2).

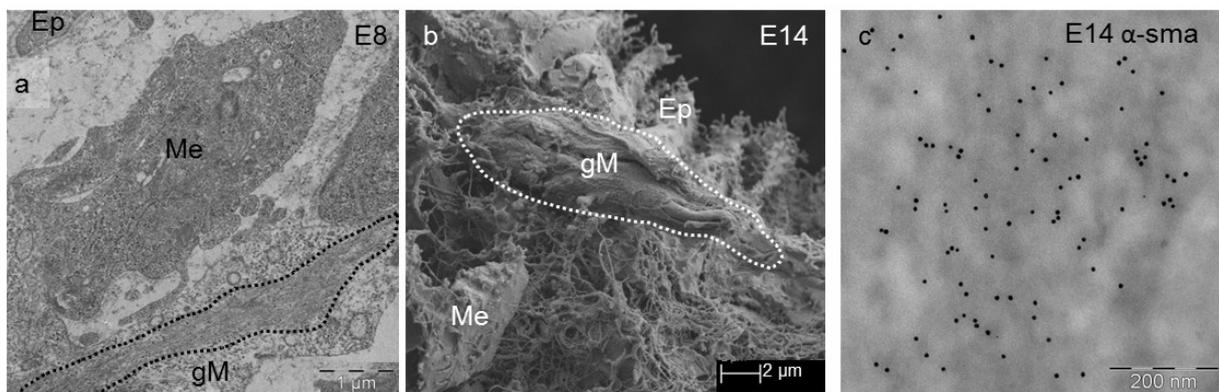


**Diagramm 2:** Prozentualer Anteil der Anti-SOX2-Immunogoldkörnern auf den Zellkernen der verschiedenen zusammengefassten Zellarten der Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16. Zusammenfassung der Zellarten Epithel (gesamt) aus Epithel „oben“ und Epithel „tief“, sowie Mesenchym (gesamt) aus „freiem“ Mesenchym, „parabronchialem“ Mesenchym und glatter Muskulatur. Ergänzend dargestellt ist die Zusammenfassung von „parabronchialem“ Mesenchym und glatter Muskulatur als „Mesenchym um die Parabronchien“. Beschreibung siehe Text.

Anmerkung: Die Berechnung der relativen Werte erfolgte über die arithmetischen Mittelwerte, welche über die Rohwerte berechnet wurden. Die Tabelle und Diagramme mit den Charakteristika der Messwerte befindet sich im Anhang S. XLIV. Aufgrund der großen Streubreite der Daten und des geringen Datensatzes erfolgte keine ausführlichere statistische Analyse und Darstellung.

### 5.3.3 Die Markierung mit Anti- *alpha* – *smooth muscle actin* -Antikörpern

Die glattmuskulären Filamente der dem Epithel anliegenden Mesenchymzellen konnten mit Anti- *alpha* – *smooth muscle actin* - Antikörpern bei den Stadien E10 bis E16 spezifisch markiert werden. Wobei das kolloidale Gold hauptsächlich auf den elektronendichteren Bereichen der glattmuskulären Filamentbereiche war (siehe Abb. 27 c). Der Bereich von glattmuskulärem Aktin konnte klar vom Organellenbereich unterschieden werden. Dabei fiel eine sehr hohe Sensitivität bei geringer Spezifität des primären Antikörpers auf, so dass sich auch auf nicht glattmuskulären Zellen deutlich kolloidales Gold findet. Wie bei den anderen Markierungen liegt auch hier unspezifisches Gold auf den Zellkernen. Im Verlaufe der Entwicklung von E10 zu E16 sind immer mehr Zellen um die Parabronchien mit Anti- *alpha* – *smooth muscle actin* - Antikörpern spezifisch markiert. Erstmals bei E8 wurden in den ultrastrukturellen Untersuchungen Anteile glatter Muskulatur in den Mesenchymzellen beobachtet (siehe Abb. 27 a).



**Abbildung 27:** Glatte Muskulatur (gM) im transmissionselektronenmikroskopischen (a), rasterelektronenmikroskopischen (b) und Anti- *alpha* – *smooth muscle actin*-Immunogoldmarkierten Aufnahmen (c) im Vergleich.

(a) Entwicklungsstadium E8 mit ersten glattmuskulären Anteilen (gM, gestrichelte Linie) im Mesenchym (Me) unter dem Epithel (Ep).

(b) Glattmuskuläre Zellen (gM, gestrichelte Linie) unter dem Epithel (Ep) eines Bronchus im Stadium E14. Mesenchymzelle (Me). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme.

(c) Im Stadium E14 mit Anti- *alpha* – *smooth muscle actin* - Immunogold markierte glattmuskuläre Filamente.

Auch die Bereiche in den einzelnen Zellen, die aus glattmuskulärem Aktin bestehen, werden in Relation zu den nicht spezifisch markierten Plasmabereichen größer und deutlicher markiert (siehe Abb. 28 b, c, d, f). Im Entwicklungsstadium E10 finden sich pro Parabronchium circa eine bis drei dem Epithel anliegende spezifisch markierte Zellen (siehe Abb. 28 b). In diesen befindet sich auf einem im Vergleich recht kleinen Bereich des Zytoplasmas eine Markierung glattmuskulärer Filamente. In den strukturellen Aufnahmen waren diese glattmuskulären Anteile im Stadium E10 in einzelnen Zellen sichtbar (siehe Abb. 28 a), bei E12 häufig sichtbar. Im Entwicklungsstadium E12 liegen die glattmuskulären Zellen in Verbänden längs beieinander verbunden durch Zellkontakte (siehe Abb. 28 c). Um sie wird eine dünne filamentäre „Basallamina-ähnliche“ Struktur sichtbar. Deutlicher werden diese glattmuskulären Zellverbände im Stadium E14 zwischen den sich bildenden Atrien (siehe Abb. 28 d), dann sind sie auch in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizierbar (siehe Abb. 27 b). In Abb. 18 c (S. 53) liegen glatte Muskelzellen längs gebündelt unter dem Epithel und heben sich somit deutlich vom lockeren Mesenchymgewebe ab. Es liegen teilweise nicht-glattmuskuläre Zellen zwischen den Verbänden und dem dem Lumen zugewandten Epithel (siehe Abb. 28 a und Abb. 19b S. 56). Diese Zellen sind kleiner mit einem höheren Kern-Plasma-Verhältnis. Wie in Abb. 28 b im Stadium E10 liegen die glattmuskulären Zellen besonders in den frühen Entwicklungsstadien auch direkt unter der Basalmembran des Epithels.

**Abbildung 28 (gegenüber):** Vergleich der ultrastrukturellen (a, e) und Anti- *alpha – smooth muscle actin* -markierten Aufnahmen (b, c, d, f) der glatten Muskelzellen bei den Entwicklungsstadien E10 bis E16.

(a) Im Stadium E10 zarte Anteile glatter Muskulatur (gM, schwarz umrandet) in einer unter der Basalmembran (Bm) liegenden Mesenchymzelle, darüber liegende Mesenchymzelle (Me) ohne ersichtliche glattmuskuläre Anteile. Epithelzelle (Ep). Epon-Ultradünnschnitt ohne Markierung.

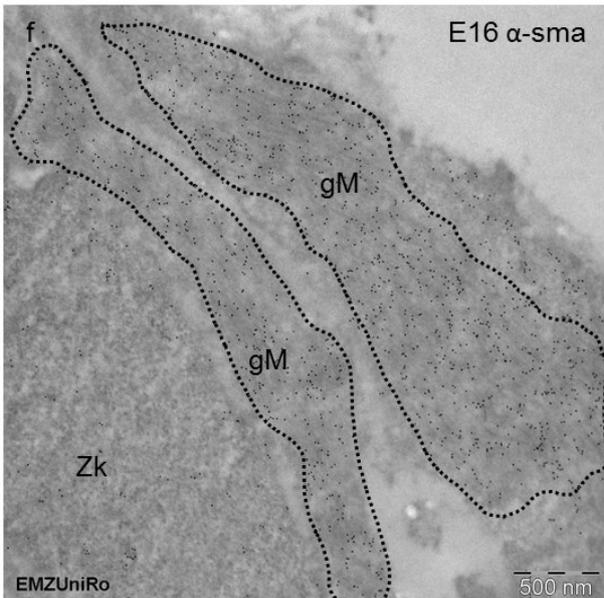
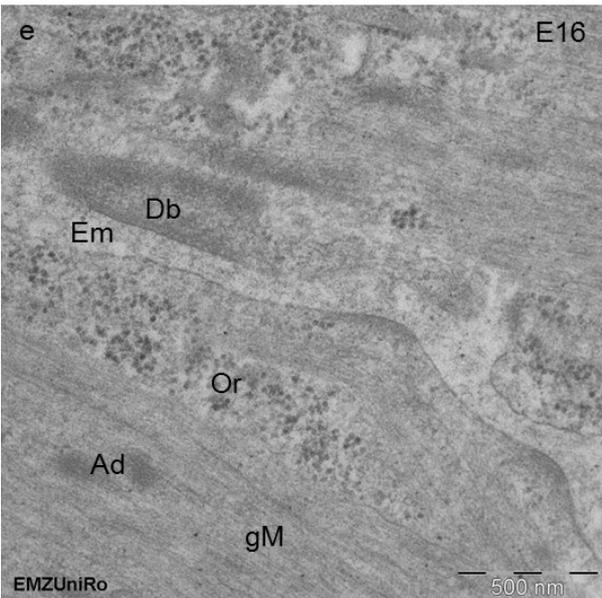
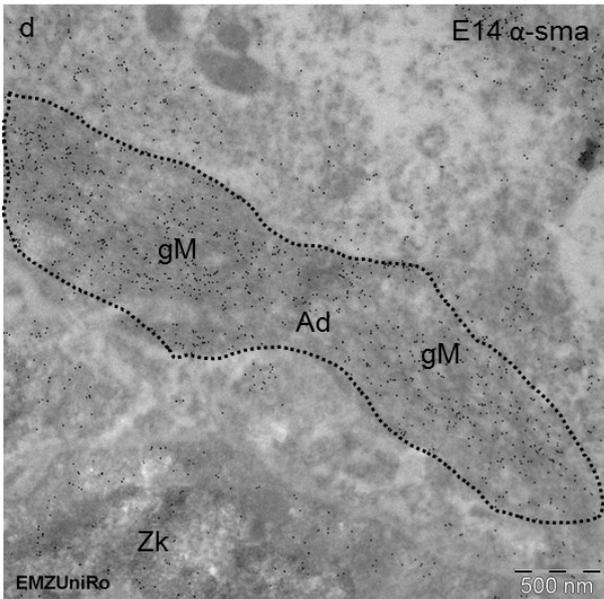
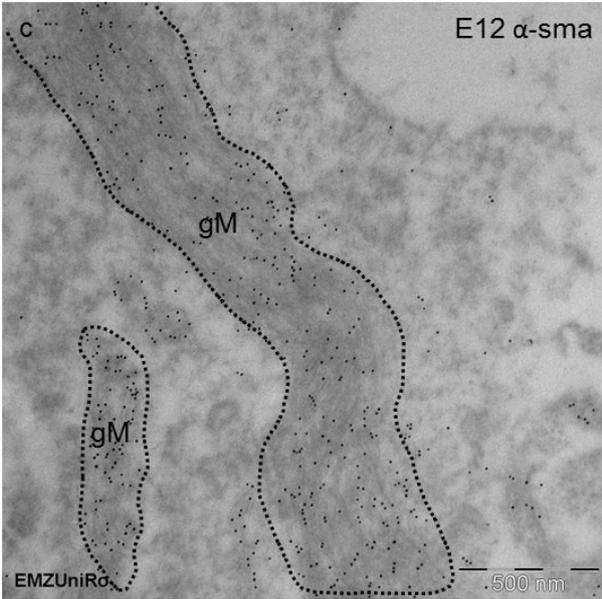
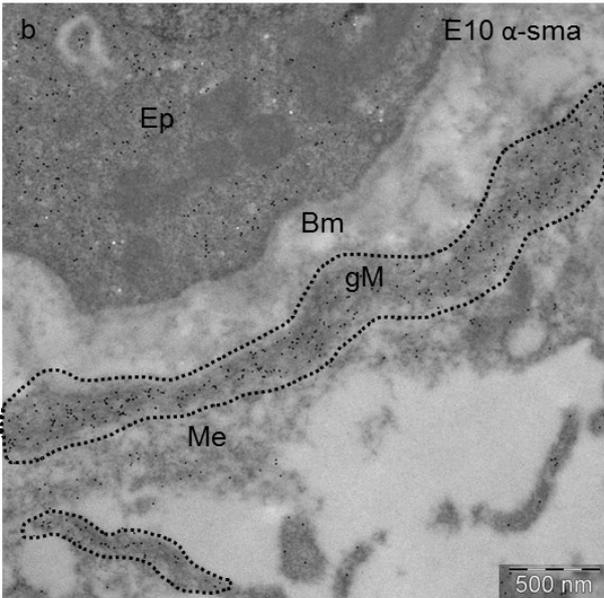
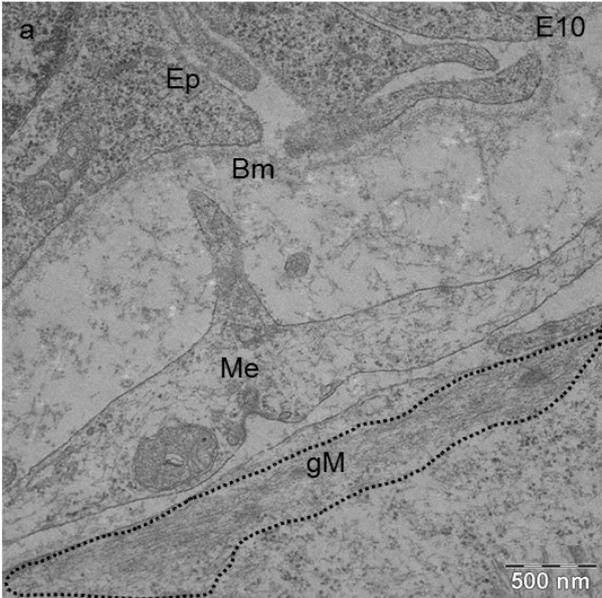
(b) Mit Anti- *alpha – smooth muscle actin* -Immunogold markierte glatte Muskelanteile (gM, schwarz umrandet) in einer Mesenchymzelle (Me) unter der Basalmembran (Bm). Epithelzelle (Ep). Stadium E10.

(c) Entwicklungsstadium E12 mit Anti- *alpha – smooth muscle actin* markierten glattmuskulären Filamenten (gM, gestrichelte Linie).

(d) Im Stadium E14 markierte glattmuskuläre Anteile (gM, gestrichelte Linie) durch ein *Dense band* (Db) verbunden. Zellkern (Zk).

(e) Im Stadium E16 Aufbau der glatten Muskulatur mit glattmuskulären Filamenten (gM), filamentfreien Bereichen für die Organellen (Or), Haftkomplexen als *Area densa* (Ad) und *Dense bands* (Db), sowie die glatten Muskelzellen verbindendes Endomysium (Em). Epon-Ultradünnschnitt ohne Markierung.

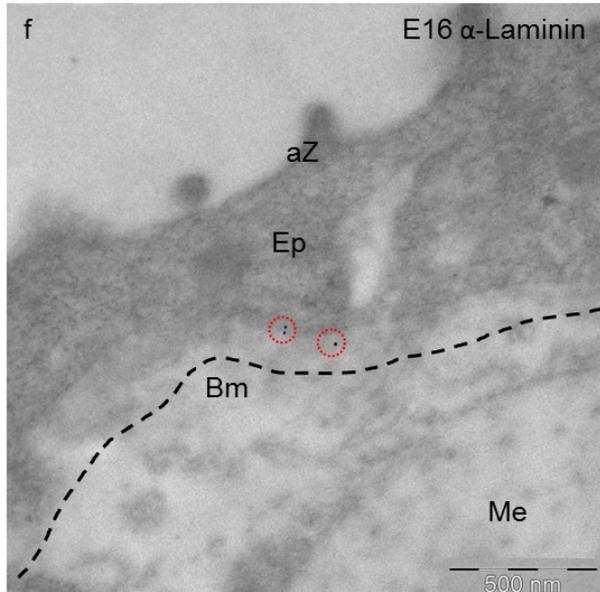
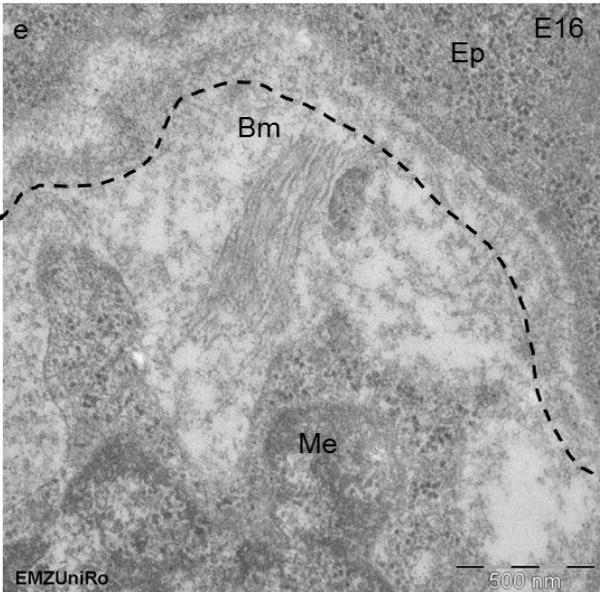
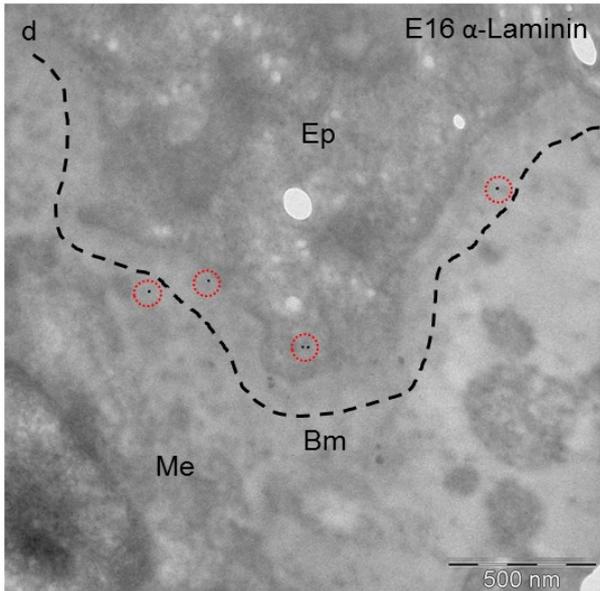
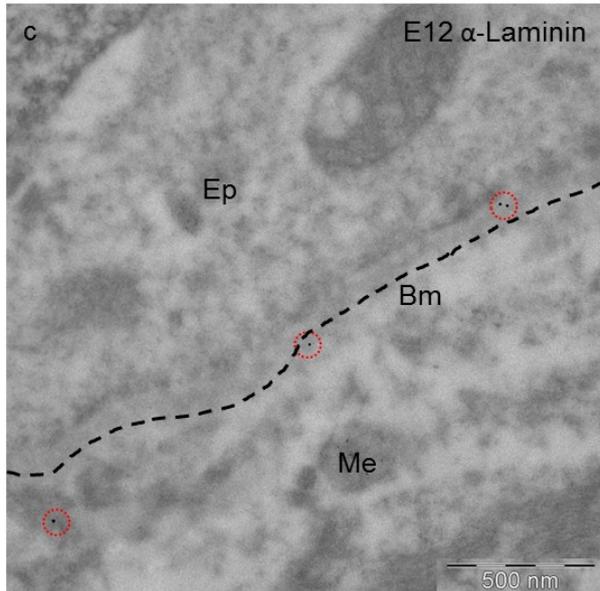
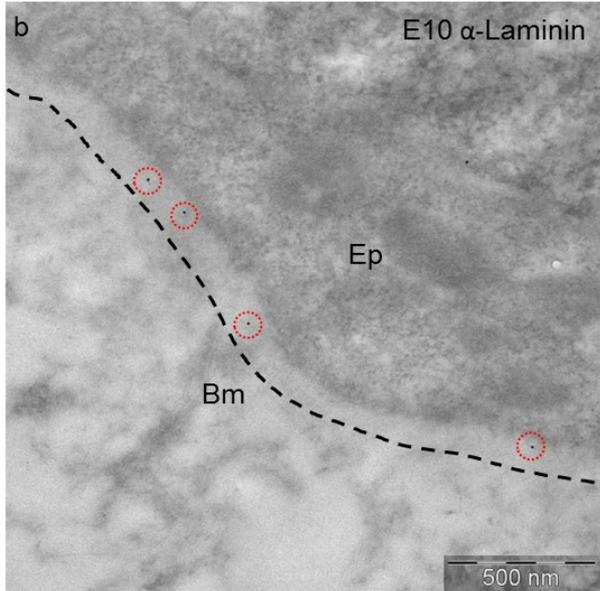
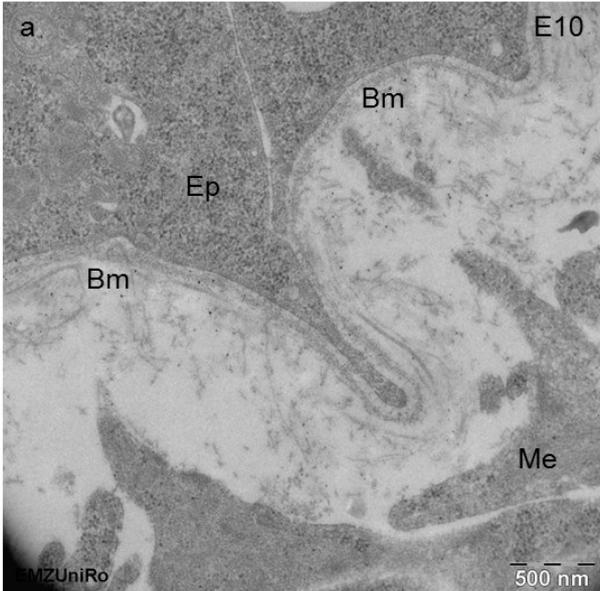
(f) Im Stadium E16 mit Anti- *alpha – smooth muscle actin* -markierte breite Bereiche von glatten Muskelfilamenten (gM). Zellkern (Zk).



Im Entwicklungsstadium E16 sind die glattmuskulären Zellen groß, langgestreckt, mit großen spezifisch markierten intrazellulären Anteilen an glattmuskulären Filamenten (siehe Abb. 28 f). Die glattmuskulären Zellen liegen fischzugartig wie zwischen den Atrien aufgespannt und sind seitlich an die Basalmembran geheftet. Direkt zum Lumen hin liegen sie in den späten Entwicklungsstadien nicht der Basalmembran unter dem Epithel an (siehe Abb. 19b S. 56). Die Organellen sind auf einige filamentfreie Plasmaanteile eingeschränkt. In den ultrastrukturellen Aufnahmen ist besonders im Stadium E16 der Feinbau der glattmuskulären Anteile ersichtlich (siehe Abb. 28 e). Die glattmuskulären Filamente liegen in großen Bereichen parallel beieinander, an einigen Stellen etwas dichter als an anderen mit innenliegenden elektronendichteren *Area densa* und ergeben so ein „fellartiges“ Erscheinungsbild. Diese glattmuskulären Filamente sind scharf vom Organellenbereich abgegrenzt. In Abb. 28 d ist eine langgestreckte *Area densa* erkennbar, welches zwei glattmuskuläre Zellbereiche miteinander verbindet. Wo die glattmuskulären Filamente an die Zellmembran angrenzen, sind sie in einigen Bereichen mittels elektronendichter *Dense bands* mit selbiger verbunden (siehe Abb. 28e). Die zentral liegenden Zellkerne sind gelappt und abgeplattet. Die glattmuskulären Zellen werden durch ein dichtes Endomysium verbunden und durch ein ebenso dichtes Perimysium umgeben. Dort wo glatte Muskelzellverbände als atriale Muskulatur seitlich an die Basalmembran grenzen, ist das Perimysium mittels extrazellulärer Filamente mit der Basalmembran verbunden. Teilweise geht das Perimysium in die *Lamina fibroreticularis* der Basalmembran direkt über.

### 5.3.4 Die Markierung mit Anti-Laminin-Antikörpern

Die Basalmembran wird spezifisch mit den Anti-Laminin-Antikörpern, aber schwächer als die Zellkerne (siehe Abb. 29 f) markiert. Besonders die *Lamina densa* und *Lamina rara* wurden markiert, kaum die *Lamina fibroreticularis* (siehe Abb. 29 b). Dort, wo das Mesenchym dicht der Basalmembran anlag, wurde deutlich mehr Gold gefunden (siehe Abb. 29 d). Im Epithel und im Mesenchym unter der Basalmembran wurde Immunogold vereinzelt auch im Zytoplasma gesehen (siehe Abb. 29 c, d). Die Markierung ist unverändert in den untersuchten Entwicklungsstadien E10 bis E16 (siehe Abb. 29 b, c, d, f). Im Stadium E12 wurden einzelne sich zur Basallamina öffnende Vesikel aus den Epithelzellen beobachtet (siehe Abb. 23b S. 62). Um die glatte Muskulatur wurde kaum Laminin markiert. Vereinzelt fand sich Gold zwischen den glatten Muskelzellen im Stadium E16. Bei allen untersuchten Entwicklungsstadien ist die Basalmembran deutlich als aus elektronendichten Filamenten bestehende Schicht *Lamina densa* und direkt unter dem Epithel liegender *Lamina rara* sichtbar (siehe Abb. 29 a). Die Filamente sind in Richtung des umgebenden Mesenchyms lockerer geschichtet und ergeben die *Lamina fibroreticularis*. Diese lockeren Filamente sind besonders in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ersichtlich (siehe Abb. 17g S. 51). In Abb. 29 e ist die Basalmembran zwischen einer Epithelzelle und einer Mesenchymzelle ultrastrukturell abgebildet. Neben den typischen feinen kreuz und quer verlaufenden Filamenten der *Lamina fibroreticularis* sind gröbere, gebündelte, parallel verlaufende Filamente vorhanden. Sowohl von den Mesenchymzellen als auch von den Epithelzellen ragen einige spitze Zellausläufer bis an die Basallamina vor (siehe Abb. 29 a). Die in den ultrastrukturellen Aufnahmen vereinzelt gefundenen direkten Kontakte zwischen Epithelzellen und Mesenchymzellen durch die Basalmembran hindurch (s. Abb. 23 S. 62) konnten in den mit Anti-Laminin markierten Präparaten auf Grund der deutlich geringeren strukturellen Auflösung und der Seltenheit der Ereignisse nicht genau detektiert werden. Die Veränderungen der Basalmembran des parabronchialen Epithels stellen die Voraussetzung zur Bildung der Blut-Luft-Schranke dar. Die Basalmembran des Epithels wird vom Stadium E10 bis E16 dünner, wobei sich besonders die *Lamina fibroreticularis* abflacht, während die *Lamina densa* und *Lamina rara* sich kaum verändern. Während im Entwicklungsstadium E10 die Basalmembran noch circa 1 bis 0,5 Mikrometer misst, erreicht sie bei E16 eine Dicke von circa 0,2 Mikrometer. Dann beginnen sich bereits die Blutkapillaren und Luftkapillaren einander so anzunähern, dass zwischen ihren Basallaminae noch circa 0,5 Mikrometer Abstand ist (siehe Abb. 20 b S. 57). In der Markierungsdichte mit Anti-Laminin konnte zwischen den untersuchten Entwicklungsstadien kein Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 29 (gegenüber):** Vergleich von strukturellen (a, e) und Anti-Laminin-Immunogold-markierten Aufnahmen (b, c, d, f) der Basalmembran bei den Entwicklungsstadien E10 bis E16.

(a) Die Basalmembran (Bm) grenzt das Epithel (Ep) vom Mesenchym (Me) ab. Entwicklungsstadium E10. Epon-Ultradünnschnitt ohne Markierung.

(b) Mit Anti-Laminin (rote Kreise) markierte Basalmembran (Bm, gestrichelte Linie) einer Epithelzelle (Ep) im Stadium E10.

(c) Im Stadium E12 mit Anti-Laminin (rote Kreise) markierte Basalmembran (Bm, gestrichelte Linie) zwischen Epithel (Ep) und Mesenchym (Me).

(d) Mit Anti-Laminin (rote Kreise) markierte Basalmembran (Bm, gestrichelte Linie) im Stadium E14 zwischen Epithel (Ep) und Mesenchym (Me).

(e) Die Basalmembran (Bm, gestrichelte Linie) zwischen dem Epithel (Ep) und dem Mesenchym (Me) im Stadium E16. Epon-Ultradünnschnitt ohne Markierung.

(f) Mit Anti-Laminin (rote Kreise) markierte Basalmembran (Bm, gestrichelte Linie) einer flachen Epithelzelle (Ep). Mesenchym (Me). Apikale Zellmembran (aZ) des Epithels. Zum Vergleich siehe Abb. 17g (S. 52) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Basalmembran im Entwicklungsstadium E10.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit über die strukturellen und ultrastrukturellen Veränderungen sowie einigen ausgewählten funktionellen Aspekten im sich bildenden Gasaustauschgewebe der embryonalen Hühnerlunge zwischen den Entwicklungsstadien E10 bis E16 wurden bereits bekannte morphologische Untersuchungen bestätigt und teilweise erheblich erweitert. Die Immunmarker Anti-E-Cadherin, Anti-SOX2, Anti-*alpha – smooth muscle actin* und Anti-Laminin wurden erstmals für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen auf der Lunge embryonaler Hühner im Entwicklungszeitraum E10 bis E16 eingesetzt. Hierbei wurden zahlreiche neue Ergebnisse zur subzellulären Verteilung dieser Marker erzielt. Darüber hinaus werden in der vorliegenden Arbeit diese immuno-elektronenmikroskopischen Ergebnisse den Untersuchungen der konventionellen Transmissionselektronenmikroskopie und der Rasterelektronenmikroskopie gegenübergestellt. Durch diesen Vergleich konnten weitere zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden.

### 6.1 Das Untersuchungsmodell und die Methode

Bjørnstad und Kollegen (2014) postulieren die embryonale Entwicklung der Hühnerlunge als Modell für die prä- und neonatale Lungenreifung des Menschen. Zum derzeitigen Stand ist die Unreife der Lunge der kritische Faktor im Überleben zu früh geborener Menschen. Es konnten Parallelen in der Entwicklung und dem Auftreten bestimmter Marker, wie unter anderem Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) und Surfactant Protein B (SpB) nachgewiesen werden (Bjørnstad et al. 2014). Auch wenn die Vögel und die Säuger gemeinsam zur Reihe der Landwirbeltiere im Unterstamm der Wirbeltiere und Stamm der Chordatiere gehören und Gemeinsamkeiten in der embryonalen Entwicklung zu beobachten sind, so bestehen doch auch Unterschiede in der Entwicklung und auf der Ebene der Signaltransduktion zwischen den Zellen. Diese Gemeinsamkeiten und Unterschiede gilt es in weiteren Untersuchungen an Hühnerembryonen herauszufinden, denn tierexperimentelle Forschung an embryonalen Hühnern birgt einige Vorteile gegenüber der Forschung an Säugetieren. Hühnerembryonen können im Vergleich zu beispielsweise Mäusen, als dem bisherigen Modell der tierexperimentellen Forschung, einfach bezogen und bebrütet werden. Es ist keine Tötung eines Muttertieres nötig und mit einfachen Mitteln kann die embryonale Entwicklung im Ei kontrolliert werden. Die Brutbedingungen der Eier in einem Inkubator unterliegen nicht so unkontrollierten Einflüssen wie die Entwicklung von Säugerembryonen im Muttertier. Somit ist die Erfolgsquote an entwickelten Embryonen höher und besser

kontrollierbar. Bei Hühnereiern ist eine in ovo Manipulation auch mit deutlich weniger Aufwand möglich als bei Säugerembryonen. Dies mögen Argumente sein, die Forschung an embryonalen Hühnern in Zukunft auszubauen und weiter zu entwickeln.

Sowohl die Anfertigung von gefärbten Semidünnschnitten als auch die Herstellung von Ultradünnschnitten für strukturelle und funktionelle Untersuchungen gelang gut mit den angegebenen Materialien und Methoden. Die Fixierung erfolgte nach Präparation der Lunge in Immersionsfixierung, wobei eine gewisse Eindringzeit in das Gewebe erforderlich ist. Eine technisch aufwendigere Perfusionsfixierung verspricht durch das bis zum Entwicklungsstadium E16 noch nicht vollständig ausgebildete Blutgefäßsystem keinen der Immersionsfixierung überlegenen Erfolg. Bei der angewandten Methode ist eine strukturelle Degradation beim Übergang vom lebenden Zustand zum fixierten Gewebe unvermeidlich, ebenso kommt es zu Artefakten durch unterschiedliche Diffusions- und Fixierungsgeschwindigkeiten der Fixierlösung genauso wie durch die Einwirkung des Fixiermittels selbst. Grundsätzlich könnten Einflüsse durch das Fixiermittel und Einbettmedium sowohl auf die Ultrastruktur als auch auf die Antigenität zwar durch Kryofixation, Kryoschnitte und ein kryoschnittfähiges Transmissionselektronenmikroskop beseitigt werden, diese waren jedoch nicht verfügbar und sind sehr kostenintensiv. Eine Optimierung der Prozesse wurde durch Aushärtung des LR White in Gelatinekapseln unter ultraviolettem Licht bei Raumtemperatur versucht, um eine bessere Erhaltung der eventuell hitzeempfindlichen Antigenstrukturen zu erhalten. Dies war erfolgreich, setzte sich aber auf Grund technischer Schwierigkeiten, wie beispielsweise der hohen Anzahl der Proben, in dieser Arbeit noch nicht durch und hat somit Potenzial für weitere Experimente. Möglicherweise sind die großen Interzellularräume, die besonders im Epithel auffallen, ebenso wie die darin gefundene kristallin anmutende Substanz Artefakte der Fixierung und Einbettung, da sie nicht bei allen Präparaten eines Entwicklungsstadiums gleich stark ausgeprägt auftraten. Die großen epithelialen Interzellularräume wurden allerdings auch in anderen Untersuchungen beobachtet (Maina 2005; Makanya et al. 2011 b).

## 6.2 Die Anatomie und Histologie

Die generellen Beobachtungen und Ergebnisse bezüglich der Anatomie und Histologie der embryonalen Hühnerlungen vom Entwicklungsstadium E8 bis E16 decken sich weitgehend mit den bereits in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (siehe Kapitel 2.2 Die embryonale Entwicklung des Atemorgansystems S. 13 ff.). Damit finden die strukturellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit grundsätzlich Bestätigung, haben jedoch weitergehende Einsichten ermöglicht. Beispielsweise wurde im Stadium E10 beobachtet, dass die Parabronchien serienartig aus den sekundären Bronchien sprossen (siehe Abb. 13 S. 43). Dies wurde ähnlich schon von Maina (2006) beschrieben, in einer weiteren Untersuchung finden Makanya und Djonov (2008), dass die Ausgusspräparate von anastomosierenden Parabronchien röhrenförmig und spitz aufeinander zulaufend sind. Wie die zusätzlichen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, haben die in Epon eingebetteten und auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ersichtlichen anastomosierenden Parabronchien kolbenförmig aufgetriebene Enden. Dies ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden und eine neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit. In den entsprechenden Schnittbildern waren das spitz endende Lumen und das verdickte Epithel an den Enden der Parabronchien sichtbar. In der bisherigen Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass die Parabronchien als epitheliale Stränge, die erst sekundär ein Lumen erhalten, ins umgebende Mesenchym einwachsen (Maina 2005). Entgegen diesen Annahmen konnten wir beobachten, dass die Parabronchien bereits von ihren aufgetriebenen Wachstumszonen an ein Lumen besitzen, welches nicht sekundär gebildet wird. In der Literatur wird das Anastomosieren der Parabronchien ab dem Stadium E12 beschrieben (Makanya et al. 2006). Makanya und Djonov (2008) beobachten diesen Vorgang erst im Stadium E17 indem die Parabronchien dünne Fortsätze zu den gegenüberliegenden Parabronchien senden. In der vorliegenden Arbeit haben die im Stadium E10 aufeinander zuwachsenden Parabronchien in E12 bereits alle mit ihren gegenüberliegenden Parabronchien anastomosiert und sind komplett durchgängig. Durch das schnelle Wachstum der Bronchien im Entwicklungsstadium E10, konnten hier Parabronchien in unterschiedlichsten Entwicklungsabschnitten untersucht werden. Bei den Parabronchien mit größerem Querschnitt wurden mehr spitze, ins Mesenchym vordringende basale Epithelausläufer gesehen, auch war ihr Epithel kuboid. Parabronchien mit geringerem Durchmesser und hochprismatischem Epithel hatten wenige bis keine basalen Epithelvorwölbungen (siehe Abb. 14 a S. 44). Da diese Epithelausläufer ein erster Hinweis auf die Bildung des zukünftigen Gasaustauschgewebes sind, kann vermutet werden, dass die Parabronchien mit dem größeren Durchmesser und häufiger vorkommenden Vorwölbungen

weiter entwickelt sind. Ebenso stellt sich, der die Parabronchien umgebende Mantel aus dichter gelagerten Mesenchymzellen um Parabronchien mit einem großen Lumen im Stadium E10 deutlicher dar. Nur bei Parabronchien mit großem Lumen waren in diesem Mesenchymmantel erste glattmuskuläre Anteile erkennbar. Dies bedeutet, dass nicht alle Parabronchien sich zeitlich exakt parallel entwickeln, sondern offenbar graduelle Entwicklungsunterschiede vorhanden sind. Auch diese beobachteten Unterschiede in der Entwicklung der Parabronchien gehen über den bisherigen Kenntnisstand hinaus.

Die beiden untersuchten Luftsackansätze gestalten sich wie bereits in der Literatur beschrieben (Maina 2005). Der mikroskopierte kraniale Ansatz eines Luftsackes des Entwicklungsstadiums E8 geht im Epithel relativ abrupt ins bronchiale Epithel über (siehe Abb. 15 S. 47). So trat der Übergang in den Bronchus deutlich hervor. Allerdings hatte der Luftsack noch kein flaches, sondern ein kubisches Epithel. Vermutlich weil er im Stadium E8 erst als Knospe existierte. Beim mikroskopierten Ansatz des kaudalen thorakalen Luftsackes bei E14 ist der Epithelübergang eher kontinuierlich (siehe Abb. 16 S. 48). Auch mündet der Luftsack in mehrere kleinere Bronchien, vermutlich Saccobronchien, die den Parabronchien gleichen. Ob aus diesen Gründen der Übergang im Epithel kontinuierlich ist oder ob, begründet durch zu große Abstände der Serienschritte, dieser Eindruck entsteht, kann nur gemutmaßt werden. Bei keinem der untersuchten Luftsackansätze konnten die von Maina (2005) und Salomon (1993) beschriebenen Zilien gefunden werden. Vielleicht treten diese Zilien später als im Stadium E16 in der Entwicklung auf, darauf deuten weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe hin (A. Reinke und M. Frank, Abstract zur Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, 2018). Neben dem zuvor beschriebenen flachen Epithel der Luftsäcke wurden zusätzlich auch Bereiche mit hochprismatischem Epithel gefunden. Eine genauere Untersuchung der Histologie der Luftsäcke des Huhns ist kürzlich in unserer Arbeitsgruppe durch E. Hempel (2017) vorgenommen worden, in der Literatur gibt es hierzu sonst keine weiteren Berichte.

### 6.3 Der elektronenmikroskopische Aufbau

Die grundlegenden Prozesse bei der Umwandlung des recht gleichmäßigen Epithels der Parabronchien im Entwicklungsstadium E10 bis zur Bildung der Atrien und *Infundibula* im Stadium E16 konnten in dieser Arbeit größtenteils genauso wie in der Literatur bisher beschrieben bestätigt werden (Vergleich Kapitel 2.2.3 Die Entwicklung des Epithels und des Gasaustauschgewebes S. 16 ff.). Maina (2005) beschreibt, dass sich die Atrien ab dem Entwicklungsstadium E15 bilden. In dieser Arbeit wurden erste Epitheleinsenkungen mit Durchbruch des die Parabronchien umgebenden Mesenchymmantels ins lockere Mesenchymgewebe bereits in E12 und unverkennbare Atrienbildung bereits in E14 beobachtet. Im Stadium E16 wurden die *Infundibula* und erste Luftkapillaren deutlich. Nach Maina (2005) treten die Luftkapillaren erst ab dem Stadium E18 auf. Im Einzelnen beschreiben Makanya und Kollegen (2011a) Mechanismen, die die Umwandlung des Epithels erklären. Die von ihnen beobachteten Prozesse der Secarecytose und Peremerecytose wurden zum Teil auch in dieser Arbeit bestätigt und durch weitere Befunde ergänzt. Die das Epithel charakterisierenden mikrovilliartigen apikalen Membranvorwölbungen, die mal kurz, mal kolbenförmig, mal länger sind, und die apikalen Vesikel und Zellteilabschnürungen, die kolbenförmig oder reißverschlussartig erscheinen, wurden ebenfalls nachgewiesen (siehe Abb. 21 S. 59). Solche mikrovilliartigen Fortsätze könnten aber auch teilweise Fixationsartefakte sein. Im Lumen wurden in Auflösung befindliche Zelltrümmer beobachtet, die nie Kernanteile enthielten. Die reißverschlussartigen Zellabschnürungen könnten ebenso schräg angeschnittene Epithelzellen sein. Um dies noch präziser zu ergründen wären Serienschnitte notwendig, die ein dreidimensionales Bild des Epithels ermöglichen. In der Literatur wurden die mikrovilliartigen Membranvorwölbungen als Reste von ins Lumen geöffneten Vakuolen betrachtet (Makanya et al 2011 a). Ebenso wurde vermutet, dass apikale Zellanteile durch konfluierende Vakuolen abgeschnürt werden. Solche großen Vakuolen oder aufgereihte Vakuolen wurden in dieser Arbeit aber nicht nachgewiesen. Es wurde von Makanya und Kollegen (Makanya et al 2011 a; Makanya et al 2006) die Hypothese aufgestellt, dass ganze Zellen aus dem Zellverband herausgeschoben werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht bestätigt. Es wurden mehrreihige Epithelzellanordnungen beobachtet, die aber auch genauso durch schräg angeschnittene Zellen verursacht sein können. Weil die im Lumen gesichteten Zelltrümmer nie Kernanteile enthielten, kann die Hypothese von Makanya und Kollegen durch die Befunde in der vorliegenden Arbeit nicht untermauert werden. In den Aposomen waren im Entwicklungsstadium E16 Zellorganellen und Kernanteile sichtbar. Hier könnten entweder

ganze Zellen aus dem Verband ausgeschlossen werden oder das Epithel war schräg angeschnitten. Die von Makanya und Kollegen (2011 a) beobachteten Vorgänge zur Umwandlung des hochprismatischen Epithels der Parabronchien in das flache Epithel des Gasaustauschgewebes wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig auch durch Immunogoldmarkierungen mit Anti-E-Cadherin untersucht. Bei der Markierung mit Anti-E-Cadherin wurde teilweise eine sehr starke Markierung der „Reißverschlüsse“ bei der von Makanya und Kollegen (2011 a) beschriebenen Secarecytose gesehen (siehe Abb. 21 d S. 59). Diese überraschende Beobachtung ist ein Hinweis, dass hier die Zellen schräg angeschnitten wurden. Für eine Abschnürung sind solch starke Zellverbindungen nicht von Nöten. Die apikalen Vesikel wurden in einigen Zellen zahlreich, in anderen überhaupt nicht beobachtet. Dies kann ebenso ein Zeichen für eine sekretorische Aktivität, als auch einen Vorgang der epithelialen Transformation sein. Würde die Abschnürung der Vesikel rein zur Verminderung der Zellhöhe stattfinden, wären sie wohl in allen Zellen ähnlich zu beobachten. Vermutlich sind diese Vakuolen ein Hinweis auf verschiedene Typen von Epithelzellen, wie beispielsweise Pneumozyten Typ I und II. Um diese weiter zu differenzieren wären zusätzliche Marker notwendig, wie zum Beispiel Anti-Surfactant Protein B für Typ II Pneumozyten. Mittels Anti-Aquaporin 5 können Typ I Pneumozyten nachgewiesen werden, spätestens ab dem Entwicklungsstadium E17 (Bjørnstad et al. 2014). Es wurden bei allen mikroskopierten Entwicklungsalterstufen im Epithel große Vesikel mit rundlichen intravesikulären Strukturen gefunden, die sowohl basal als auch apikal auftraten. Ob solche Einschlüsse Vorstufen der lamellierten osmiophilen Körperchen sind, kann nur vermutet werden. Diese sollen nach Makanya und Kollegen (2011a) erst ab dem Entwicklungsstadium E18 deutlich erscheinen. Die hier beobachteten Strukturen sind zudem nicht zentrisch lamelliert und nicht so stark osmiophil wie in der Literatur abgebildet (Makanya et al. 2011 a). Die wiederholt vorgefundenen geometrischen Anordnungen im Zytoplasma sind vermutlich Artefakte. Ursächlich ist das zellorganeldichte Zytoplasma, das auf Grund der Fixierung, Entwässerung und Einbettung weiter schrumpft und konzentriert wird. Somit konzentrieren sich Organellen und Stoffe und nehmen die räumlich günstigste kristallin anmutende Form an. Die sowohl im Epithel als auch im Mesenchym gefundenen Zilien (siehe Abb. 22 S. 60) können ein Hinweis auf die auch bei den Säugern gefundenen primären Zilien sein, welche eine wichtige Rolle in der Organ- und Gewebedifferenzierung und Positionierung haben (Fry et al 2014). In den untersuchten Entwicklungsstadien wurden diese Zilien bei den Hühnern erstmalig in dieser Arbeit näher beschrieben. Ähnlich verhält es sich mit Zell-Zell-Kontakten von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen. Grant und Kollegen

(1983) beschreiben bei Lungen von embryonalen Ratten Diskontinuitäten der Basallamina durch die Typ II Pneumozyten mit interstitiellen Zellen Kontakt aufnehmen. Dass in der vorliegenden Arbeit auch im Haushuhn ähnliche Kontakte zwischen Epithelzellen und Mesenchymzellen durch Basallaminaunterbrechungen beschrieben wurden, ist neu (siehe Abb. 23 S. 62). Ob diese Beobachtungen Hinweise auf eine epithelial-mesenchymale-Transition oder eine direkte Kommunikation zwischen den Zellen sind, kann bisher nur spekuliert werden. Es wurde kein Hinweis darauf gefunden, dass komplette Zellen die Basallamina passieren. Wie von Krügel und Miosge (2010) beschrieben, wird im Allgemeinen die epithelial-mesenchymale Transition von einer verminderten Expression von Laminin in der Basalmembran und E-Cadherin im Epithel begleitet (Kruegel und Miosge 2010). Aufgrund der Seltenheit der beobachteten Kontakt ereignisse und der geringen Sensitivität des Anti-Laminin-Antikörpers konnte in dieser Arbeit weder ein Hinweis auf eine veränderte Dichte der Markierungen mit Anti-Laminin noch eine Korrelation mit der Expression von E-Cadherin an solchen Stellen beobachtet werden. Wie Maina (2003b) beschreibt, sind die freien Mesenchymzellen auch gemäß unserer Untersuchungen mit langen Fortsätzen und großen zentralen Kernen ausgestattet. Ab dem Entwicklungsstadium E10 konnten erste spärliche Anteile glattmuskulärer Filamente in den an das parabronchiale Epithel anliegenden Mesenchymzellen identifiziert werden. In einzelnen Vorstudien waren sogar bereits im Stadium E8 Anteile glatter Muskulatur um die Bronchien erkennbar. Glatte Muskelzellen waren bereits durch Untersuchungen mit *Anti-alpha - smooth muscle actin* im Entwicklungsstadium E10 auf Paraffinschnitten deutlich (Makanya et al. 2011a; Rau 2011). Bis zum Stadium E16 formierten sich die glattmuskulären Zellen zu den klassischen fischzugartigen Verbänden an den Spitzen der Atrien. Diese Entwicklung deckt sich mit den Beschreibungen in der Literatur (Maina 2005). Allerdings liegen die glattmuskulären Zellen nicht immer unmittelbar der Basallamina an, wie Makanya und Kollegen (2011a) annehmen. Besonders in den späteren Stadien fällt auf, dass die glatten Muskelzellen zwar seitlich an die Basallamina der Atrien angeheftet sind, aber in Richtung des parabronchialen Lumens auch weitere, nicht-muskuläre Zellen zwischen ihnen und der Basallamina liegen. Der Frage, ob diese weiteren mesenchymalen Zellen nach dem Entwicklungsstadium E16 gegebenenfalls noch durch Apoptose untergehen, konnte in dieser Arbeit noch nicht weiter nachgegangen werden. Es wurden aber einzelne, sich in Auflösung befindliche Mesenchymzellen unter der epithelialen Basalmembran beobachtet. Für die Klärung dieser Frage sind demnach weitere Studien an späteren Entwicklungsstadien des Huhns notwendig. Wie von Makanya und Kollegen beschrieben wurde im Mesenchym apoptotischer Zellabbau auch direkt unter der

Basalmembran beobachtet (Makanya et al. 2011 a; Makanya et al. 2006). Um diesen genauer zu erfassen, können in weiterführenden Untersuchungen Marker für Apoptose, wie beispielsweise Anti-Caspase genutzt werden, das in der Säugerylunge in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich für lichtmikroskopische Auswertungen verwendet werden konnte (Bertemes 2011). Maina (2005) schreibt, dass im Gasaustauschgewebe der Vögel die individuellen Basallaminae der Endothel- und der Epithelzellen direkt, ohne Zwischenraum aufeinander liegen. In der Entwicklung der Blut-Luft-Schranke werden die interstitiellen Zellen zwischen Endothel und Epithel verdrängt oder durch Apoptose eliminiert (Maina 2005). In der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung der Hühnerlunge noch nicht so weit fortgeschritten, dass der von Maina (2005) beschriebene Aufbau der Blut-Gas-Barriere vollständig beobachtet werden konnte. In den ultrastrukturellen Abbildungen war teilweise noch ein etwa 0,5 Mikrometer breiter Zwischenraum zwischen den benachbarten Basallaminae sichtbar, in dem unter Umständen noch einzelne langgezogene Zellfortsätze von Mesenchymzellen vorhanden waren. Die Blut-Gas-Barriere hat sich damit bereits deutlich den Werten beim erwachsenen Haushuhn von etwa 0,32 Mikrometer angenähert (Makanya et al. 2013).

## 6.4 Die Immunmarkierungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die zuvor auf Paraffinschnitten etablierten Antikörper, Anti-E-Cadherin, Anti-*alpha – smooth muscle actin*, Anti-SOX2 und Anti-Laminin, sich auch für die Immunelektronenmikroskopie im Transmissionselektronenmikroskop eignen. Sie verbinden sich mit dem Ort der Antigene und grenzen ihn wesentlich präziser ein, als dies mit Markierungen auf histologischen Paraffinschnitten möglich ist. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Protokollen (siehe Anhang S. XXXIX ff. Protokolle 26 bis 29) ließen sich gut auswertbare und quantifizierbare spezifische Immunfärbungen durchführen. Die immunelektronenmikroskopische Verwendung der oben genannten Antikörper auf der embryonalen Hühnerlunge ist bisher einmalig. In der Methodenkritik ist anzumerken, dass bei dieser sensitiven Methode trotz gleicher Protokolle bei allen Markierungen teils deutliche Unterschiede in der Markierungsdichte sowohl zwischen Präparaten gleichen Entwicklungsstadiums als auch auf einem Präparat beobachtet wurden. Die Ursachen können durch die bei Immunogoldmarkierungen bekannten Anfälligkeiten für geringste Störfaktoren erklärt werden. Unter anderem sind es folgende Punkte, die das Endergebnis beeinflussen können: Beim Verdünnen der Antikörper ist stets auf gleichmäßige Lösung, als auch auf Schutz vor proteolytischer oder physikalischer Zerstörung der Antikörper, insbesondere der gold-gekoppelten Antikörper zum Beispiel durch zu starkes Schütteln beziehungsweise Vortexen zu achten. Vermutlich wirkt sich ebenfalls das Alter der Präparate als auch der angefertigten Schnitte auf die Antigen-Antikörperbindung aus. Für die vorliegende Untersuchung wurden, soweit möglich, meist frisch geschnittene Dünnschnitte für die Markierungen verwendet, um solche Einflüsse zu minimieren. Ebenso ist die Auswertung der Markierungen erschwert, da nicht immer zweifelsfrei zwischen Hintergrund und spezifischer Markierung unterschieden werden kann. Wenn Gold im Zytoplasma gesehen wird, kann dies beispielsweise auf Vorstufen der gesuchten membranständigen Antigene hinweisen, welche gerade im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat produziert oder transportiert werden. Auf Grund der indirekten Markierung der Antigene mit kolloidalem Gold und der Größe der Antikörper kann ein Abstand von 15 bis 30 Nanometern zwischen dem Epitop und dem sichtbaren Goldkolloid bestehen (Hermann et al. 1996). Dieses Artefakt könnte methodisch durch die Verwendung direkt mit kolloidalem Gold markierter Antikörper verringert werden.

Die Verteilung von E-Cadherin beim Haushuhn sowie auch auf der embryonalen Hühnerlunge ist grundsätzlich bekannt (Gallin et al. 1983; Takeichi 1988; Rau 2011, Bertemes 2012; Hempel 2017). Es zeigte sich stets eine klare, apikal betonte Verteilung von

E-Cadherin bei den histologischen Immunfärbungen des Epithels (Rau 2011). Die genaue Verteilung von E-Cadherin in Lungenepithelzellen des Huhns während der Entwicklung wurde jedoch in dieser Arbeit erstmalig auf ultrastruktureller Ebene untersucht (siehe Abb. 24 S. 64 und 25 S. 66). Die Markierung mit Anti-E-Cadherin ist spezifisch auf den apikalen *Adhaerens junctions*. Dies begründet sich unter anderem durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers und der geringen unspezifischen Bindung. Es gibt mögliche Kreuzreaktivitäten des verwendeten Antigens zwischen E-Cadherin und verwandten Cadherinen, jedoch ist in der Histologie und Elektronenmikroskopie stets eine eindeutige Zuordnung der markierten Zellen und subzellulären Strukturen möglich, anders als bei Verwendung des Antikörpers im Western Blot. Zur besseren Differenzierung zwischen *Adhaerens junctions* und *Tight junctions*, könnte in weiterführenden Untersuchungen zusätzlich ein spezifischer Marker für *Tight junctions* wie beispielsweise Anti-Occludin mit dem Anti-E-Cadherin-Antikörper kombiniert werden (Wolburg et al. 2001; Nasdala et al. 2002). Neben den *Adhaerens junctions* der apikalen Haftkomplexe wurden seitliche *Adhaerens junctions* und schwächer auch basale *Punctia adhaerentia* über der Basalmembran markiert. Somit kommt wie von Säugern bekannt das E-Cadherin auch in der embryonalen Hühnerlunge in den *Adhaerens junctions* sowohl apikal als auch seitlich der Epithelzellen vor (Nollet et al. 2000). Dass auch die basalen *Punctia adhaerentia* mit Anti-E-Cadherin markiert sind, was so im Lichtmikroskop nicht erkennbar ist, betont den großen Vorteil der Immunogoldtransmissionselektronenmikroskopie gegenüber der lichtmikroskopischen Immunhistologie. Da sich Anti-E-Cadherin auf embryonalen Hühnerlungen mit der Immunogoldtechnik als sicherer und verlässlicher Marker für die *Adhaerens junctions* bewiesen hat, kann dieser Antikörper in weiteren Experimenten einen bedeutenden Beitrag zur Erforschung und genaueren Untersuchung der Umwandlungsvorgänge in Epithelien und bei der epithelial-mesenchymalen-Transition leisten. Die enorme Bedeutung des E-Cadherins in der Prognostik vieler Tumorerkrankungen, beispielsweise beim Vorgang der Metastasierung, unterstreicht den generellen Wert der Erforschung der E-Cadherin Expression im weiteren Rahmen medizinischer Grundlagenforschung (Gall und Frampton 2013).

SOX2 ist ein in der Lungenentwicklung von Säugern und Vögeln bedeutender Transkriptionsfaktor, der in der vorliegenden Arbeit erfolgreich weiter untersucht werden konnte (Ishii et al. 1998; Rau 2011; Herriges und Morrisey 2014; Hempel 2017; siehe Abb. 26 S. 68). Durch die Auszählung der Anti-SOX2-Markierung konnten die lichtmikroskopischen Beobachtungen an Anti-SOX2 markierten Schnitten der embryonalen Hühnerlunge erstmalig quantifiziert werden. Im Lichtmikroskop kann durch eine geringe Zelldichte, wie beispielsweise im lockeren Mesenchym, eine scheinbar geringere Markierungsdichte

vorhanden sein, ebenso kann durch eine hohe Zelldichte, wie im Epithel, eine augenscheinlich hohe Markierungsdichte angezeigt werden, während in Bezug auf die Zellfläche tatsächlich ganz ähnliche, vergleichbare Markierungsdichten vorliegen. In dieser elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden in den Entwicklungsstadien E10 bis E16 sowohl das Epithel als auch das Mesenchym markiert. Insgesamt stieg die prozentuale Dichte der Goldkörner pro Quadratmikrometer Zellkernfläche vom Entwicklungsstadium E10 bis E16 im Epithel an und sinkt im Mesenchym ab (siehe Diagramm 2 S. 70). Letzteres mit Ausnahme des Anteils glattmuskulärer Zellen, bei denen ein Anstieg der Markierungsdichte stattfindet: wie in den lichtmikroskopischen Studien (Rau 2011) beobachtet, steigt die prozentuale Markierungsdichte der Goldkörner im glattmuskulären Mesenchym bis zum Stadium E16 deutlich an (siehe Diagramm 1 S. 69). Dieser deutliche Anstieg von SOX2 in den glattmuskulären Zellen kann auch den beobachteten relativen Anstieg der Markierung von Zellen um den Parabronchus (welcher sich aus den „parabronchialen“ Mesenchymzellen und den glattmuskulären Zellen zusammensetzt) beeinflussen. Nicht zuletzt könnte der beobachtete Anstieg in den glattmuskulären Zellen auch mit dem Anstieg der Markierungsdichte in den „oberen“, dem Lumen zugewandten Epithelzellen in Zusammenhang stehen, da sich diese Epithelzellen direkt über der glatten Muskulatur befinden. Dies lässt eine graduelle Verteilung von SOX2 im Epithel und Mesenchym vermuten. Tatsächlich steigt in den „oberen“, dem Lumen (und den glatten Muskelzellen) zugewandten Epithelzellen die Goldkorndichte stärker an als im „tiefen“/atrialen Epithel (fern der SOX2 positiven glatten Muskelzellen). In jüngeren Stadien scheint die Summe der Goldkornmarkierungen aus den Epithelarten im Entwicklungsstadium E14 gesamt ähnlich dem Wert des undifferenzierten Epithels zum Stadium E12. Da sich das Epithel erst später in „tiefes“/atriales und dem Lumen zugewandtes, „oberes“ Epithel differenziert, scheinen diese Werte somit plausibel. Entgegen den Ergebnissen von Ishii und Kollegen (1998) und analog vorhergehender Untersuchungen auf Paraffinschnitten von Rau (2011) und E. Hempel (2017) wird in dieser Arbeit SOX2 auch in späteren Entwicklungsstadien deutlich später als Stadium E9 sowohl im Epithel als auch insgesamt im Mesenchym gefunden. Weil Anti-SOX2 sich spezifisch sowohl auf Epithelzellen als auch auf mesenchymalen Zellen befindet, eignet sich dieser Marker besonders gut für weitere Untersuchungen zu epithelial-mesenchymalen Interaktionen und insbesondere zur Analyse der Spezifizierung der atrialen glatten Muskulatur. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind auch für weitere Untersuchungen zur Rolle von SOX2 als Stammzell- und Differenzierungsfaktor wichtig: SOX 2 ist einer der vier Faktoren, mit denen es gelang eine Reprogrammierung menschlicher somatischer Zellen in pluripotente Stammzellen durchzuführen (Yu et al. 2007). Die genauere

Erforschung der Rolle von SOX2 bei Differenzierungsprozessen und Erkrankungen wird daher künftig von großer Bedeutung sein.

Methodenkritisch ist anzumerken, dass bei allen untersuchten Antikörpern eine mehr oder weniger deutliche Markierung auch des Zellkerns gefunden wurde. Diese kommt durch die Ladung vieler Kernproteine beziehungsweise der DNA in ihrer Wirkung auf kolloidales Gold zustande (Vergleich Kapitel 4.2 Die Immunogoldmarkierung S. 37 ff.). Da bei SOX2 eine überwiegend kernspezifische Markierung erwartet wird, kann somit nicht sicher zwischen dieser Hintergrundfärbung und der spezifischen Markierung auf dem Zellkern unterschieden werden. Trotz der Polyklonalität des Antikörpers erweist er sich in der verwendeten Verdünnung als ausgezeichnet spezifisch, welches durch die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse und in lichtmikroskopischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe unterstrichen wird (Rau 2011; Hempel 2017). Es ist möglich, dass durch die vorhandene Hintergrundfärbung stärkere Unterschiede zwischen den einzelnen Zellarten verringert werden. Wäre die Bindung allerdings rein unspezifisch, wären keine so eindeutigen Trends in der Veränderung der relativen Werte in den einzelnen Zellarten zu beobachten. Es wäre eine gleichmäßige Markierung der Zellkerne im selben Gewebe zu beobachten, genau gegensätzlich zur beschriebenen differentiellen Markierung der Epithel- und Mesenchymzellen (siehe oben). Da die Zellen für Abbildungen und Statistik, trotz standardisierter Kriterien (Zellen mit gut und vollständig sichtbarem Zellkern, ohne Beeinträchtigung durch Falten, Schmutz oder Löcher) subjektiv ausgewählt wurden, je nach Eignung zur Messung, sind dadurch Verzerrungen der Werte möglich. Aufgrund des geringen Datensatzes sind die berechneten Parameter besonders der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung statistisch betrachtet nur zur groben Vororientierung geeignet. Bei den Daten fällt auf, dass bei 14 von 16 Tieren der Median unter dem Mittelwert liegt, bei zwei Tieren liegt er oberhalb des Mittelwertes. Diese Unterschiede ergeben sich aus der Charakteristik der Wertemenge. Aufgrund der großen Streubreite der Daten und des geringen Datensatzes wurde auf eine ausführlichere statistische Analyse verzichtet. Um die Ergebnisse statistisch zu erhärten, wären deutlich mehr Messungen nötig gewesen. Diese hätten jedoch den Rahmen der Arbeit sehr stark ausgedehnt. Zwischen den Entwicklungsstadien E10 und E12 sinken alle Goldichten auf dem Kern absolut ab. Dies könnte ein systemischer Fehler sein. Begründet darin dass das Stadium E10 zeitlich acht Monate vor E12 markiert wurde. Auch wurden die Stadien E10 und E16 mit einem älteren sekundären Antikörper gefärbt. Im Laufe der Serie von Immunfärbungen war es notwendig, eine neue Charge eines sekundären Antikörpers zu verwenden (Entwicklungsstadien E14 und E12), da die gold-gekoppelten Antikörper nur eine begrenzte Lagerfähigkeit haben. Um solche Faktoren herauszunehmen,

wurden für die Auswertung jeweils auch die relativen Werte angegeben. Die Differenzierung der Zellarten in dem Lumen abgewandte/“tiefe“ und dem Lumen zugewandte/“obere“ Epithel, ebenso wie in glattmuskuläre versus „parabronchiale“ Mesenchym ab E14 scheint bei näherer Betrachtung nicht so klar, wie im Mikroskop zu sein. So kann bei glattmuskulären Zellen der glattmuskuläre Anteil nicht angeschnitten und sie somit als einfaches „parabronchiales“ Mesenchym fälschlicherweise gezählt und dessen Werte verzerrt haben. Trotz aller technischen Einschränkungen und Unwägbarkeiten ist eine quantitative Auswertung der Immunmarkierung mit Anti-SOX2 möglich.

Makanya und Kollegen (2006) schreiben, dass die Parabronchien der Hühnerlunge im Entwicklungsstadium E8 von einer unterbrochenen Schicht *alpha - smooth muscle actin*-positiver Zellen umgeben sind. Auf Paraffinschnitten embryonaler Hühnerlungen der Entwicklungsstadien E8, E10, E12, E15 und E18 wurde glattmuskuläres Aktin von Rau (2011) angefärbt. Hierbei wurde sichtbar, dass die bei E8 noch geschlossene Schicht markierten Mesenchyms um das parabronchiale Epithel herum ab E10 unterbrochen wurde (Rau 2011). In der vorliegenden Literatur wird auf den histologischen Schnitten eine deutliche Markierung der Mesenchymzellen um die Parabronchien im Stadium E10 mit auftretenden in der Größe zunehmenden Unterbrechungen bis E16 beschrieben. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit über den bisherigen Kenntnisstand hinaus auch auf Ultradünnschnitten im Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden. Bei den Untersuchungen mit Anti-*alpha - smooth muscle actin*-Antikörper wurde, wie in den ultrastrukturellen Untersuchungen ein deutlicher Anstieg sowohl der spezifisch markierten Zellen als auch der spezifisch markierten Zellanteile im Mesenchym um die Parabronchien beobachtet (siehe Abb. 28 S. 72). Da der verwendete Anti-*alpha - smooth muscle actin*-Antikörper eine sehr hohe Sensitivität hat, kann auch mit geringerer Konzentration als der in dieser Arbeit verwendeten 1:1000 eine noch höhere Spezifität erreicht werden. Auf Grund der geringen Spezifität wurde bei der Markierung mit Anti-*alpha - smooth muscle actin* ein spezieller Block-Puffer nötig. Durch die dichte Markierung mit Anti-*alpha - smooth muscle actin* war die Auswertung der Bilder erschwert und erforderte einen geschulten Blick. Besonders bei den kleinen Anteilen an glattmuskulären Filamenten im Entwicklungsstadium E10 mussten spezifisch markierte Bereiche gesucht werden. Diese wenigen markierten Anteile bei E10 scheinen auf den ersten Blick den oben genannten Untersuchungen, bei denen im Stadium E10 eine deutliche Färbung beobachtet wurde, zu widersprechen. Der Unterschied wird vermutlich auf eine in den histologischen Schnitten deutlich schwerer zu beurteilende Markierungsdichte zurückzuführen sein und ist somit gut mit den bekannten Ergebnissen vereinbar. Somit hat sich Anti-*alpha - smooth muscle actin* als hervorragender Marker für die glattmuskulären

atrialen Strukturen und deren Entwicklung auch im Transmissionselektronenmikroskop bewiesen.

Calvitti und Kollegen (2004 ) fanden bei Hühnerlungen des Entwicklungsstadiums E11 Laminin an den Bronchien. Auch an den Paraffinschnitten der embryonalen Hühnerlunge, angefertigt von E. Hempel, gelang eine Färbung der Basalmembran in allen untersuchten Entwicklungsstadien mit Anti-Laminin-Antikörpern (unveröffentlichte Resultate). Im Transmissionselektronenmikroskop wurde Laminin in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal mittels Immunogoldlabeling markiert. Die Markierung mit Anti-Laminin war außerhalb des Zellkerns spezifisch auf der Basallamina (siehe Abb. 29 S. 76). Durch die geringe Sensitivität, trotz der Polyklonalität des Antikörpers war die Markierung allerdings auch bei hoher Konzentration von 1:20 des primären Antikörpers gering. Hohenester beschreibt, dass Laminin in der *Lamina densa* erscheint (Hohenester und Yurchenco 2013). Das deckt sich mit den gemachten Beobachtungen, in denen die stärkste Markierung auf der *Lamina densa* und *Lamina rara* zu beobachten war und kaum auf der *Lamina fibroreticularis*. Hohenester und Yurchenco (2013) beschreiben, dass bei Kryofixation keine *Lamina rara* der Basalmembran beobachtet wird. Somit könnte die hier beobachtete *Lamina rara* auch ein Artefakt der chemischen Fixierung und Einbettung darstellen. Laut Schuger (1997) wird Laminin in der embryonalen Säugerlunge sowohl vom Epithel als auch vom Mesenchym gebildet. Wenn dies beim Haushuhn genauso abläuft, kann erklärt werden, warum einzelne kolloidale Goldkörner sowohl in den Epithelzellen als auch in den Mesenchymzellen auftauchen. Weil Anti-Laminin-Antikörper auch im Transmissionselektronenmikroskop spezifisch die Basallamina markieren, eignet er sich besonders für die Untersuchung der Veränderungen der Basallaminae in der Bildung der Blut-Luft-Schranke der Vogellunge. Diese Veränderungen betreffen sowohl die direkten Kontakte zwischen Epithel- und Mesenchymzellen als Hinweis auf eine epithelial-mesenchymale Transition, als auch die notwendige Abflachung der zukünftigen Blut-Luft-Schranke. Bei der Entstehung von Krebs und der Metastasierung findet ebenfalls eine epithelial-mesenchymale Transition mit einer verminderten Expression von Laminin und E-Cadherin statt (Kruegel und Miosge 2010). Nicht nur dieser Zusammenhang ist bedeutsam, sondern auch der Fakt, dass Laminin eine Bindungsstelle für viele invasive Mikroben und Viren darstellt (Durbeej 2010). Somit sollen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse als Grundlage für weitere Untersuchungen zugunsten der menschlichen Gesundheit dienen.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle und funktionelle Aspekte in der embryonalen Entwicklung des Gasaustauschgewebes der Vogellunge am Beispiel des Haushuhnes untersucht. Dabei wurde auf den Zeitraum zwischen den Entwicklungsstadien E10 bis E16, entsprechend zehn bis sechzehn Bebrütungstagen, fokussiert. Um die dabei stattfindenden strukturellen Veränderungen und Entwicklungsvorgänge zu untersuchen, wurde Lichtmikroskopie an Semidünnschnitten, Transmissionselektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten und Rasterelektronenmikroskopie als Methoden eingesetzt. Darüber hinaus wurden im Transmissionselektronenmikroskop funktionelle Zusammenhänge mittels Immunogoldtechnik mit den Markern Anti-E-Cadherin, Anti-SOX2, Anti-*alpha-smooth muscle actin* und Anti-Laminin dargestellt. Ziel der Untersuchungen war es, ein detailliertes Verständnis der epithelial-mesenchymalen Interaktionen bei der Lungenentwicklung und insbesondere bei der Bildung des Gasaustauschgewebes im Zusammenhang mit funktionellen und strukturellen Aspekten zu erlangen. Dazu wurden Hühnereier bebrütet und die Lungen in den entsprechenden Entwicklungsstadien präpariert, chemisch fixiert und entweder für die Transmissionselektronenmikroskopie in Kunstharze eingebettet oder für die Rasterelektronenmikroskopie durch Kritisch-Punkt-Trocknung aufgearbeitet. Ultrastrukturelle Untersuchungen wurden an in Epon eingebetteten Proben durchgeführt, die Immunogoldmarkierungen erfolgten an Ultradünnschnitten von in LR White eingebetteten Proben. Für die oben genannten Immunmarker wurden erfolgreich Markierungsprotokolle entwickelt und die entstandenen Präparate im Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet.

Bezüglich der strukturellen Entwicklung der Parabronchien in den Stadien E10, E12, E14 und E16 konnten viele bekannte Beobachtungen bestätigt und darüber hinaus verfeinert werden. Beispielsweise konnte beobachtet werden, dass die Parabronchien im Stadium E10 in ihrem Entwicklungsstand leichte Unterschiede aufweisen und mit kolbenförmig aufgetriebenen Enden aufeinander zu wachsen. Die bei der funktionellen Umwandlung des Lungenepithels postulierten Vorgänge der Secarecytose und Peremerecytose konnten auch in dieser Arbeit grundsätzlich nachgewiesen werden, jedoch zeigt die Kombination der histologischen und elektronenmikroskopischen Methoden einige klärungsbedürftige Aspekte dieser Prozesse, wie die mutmaßliche Rolle der apoptotischen Vorgänge beim Umbau des Epithels. Ergänzend konnten beispielsweise auch Zellkontakte zwischen Epithel- und Mesenchymzellen durch die Basalmembran hindurch sowie das Vorkommen einzelner Zilien in den Zellen des sich

bildenden Gasaustauschgewebes nachgewiesen werden. Neue strukturelle Einblicke gelangen außerdem durch die Serienschnittuntersuchung zweier Luftsackansätze im Entwicklungsstadium E8 und E14.

Mit den verwendeten Markern konnten bei den Immunogoldmarkierungen spezifische Anfärbungen erzielt werden. Anti-E-Cadherin diente der Charakterisierung des Epithels der Parabronchien. Unter anderem wurden mit den goldgekoppelten Sekundärantikörpern spezifisch die *Adhaerens junctions* der Epithelzellen sowohl apikal, als auch basolateral markiert, ebenso *Punctia adhaerentia* der Epithelzellen über der Basalmembran. Der Transkriptionsfaktor SOX2 konnte sowohl in Epithel- als auch in Mesenchymzellen nachgewiesen werden. Das Immunogold fand sich spezifisch auf den Zellkernen und konnte dort ausgezählt, sowie für eine quantitative Auswertung mit der gemessenen Kernfläche in Relation gesetzt werden. Die detaillierte Auswertung ergab, dass das Immunogoldsignal für SOX2 pro Kernfläche im beobachteten Entwicklungszeitraum im Epithel zunimmt, während es im Mesenchym abnimmt. Dabei ist allerdings ein starker Anstieg der SOX2 Expression in den glattmuskulären Zellen zwischen den Entwicklungsstadien E14 und E16 ersichtlich. Auch im „oberen“, dem Lumen zugewandten Epithel steigt dieser Index für die SOX2 Expression im Verhältnis stärker an, als im „tieferen“ Epithel, welches die Atrien bildet und auskleidet. Die glattmuskulären Zellen in der embryonalen Vogellunge wurden mittels *Anti-alpha-smooth muscle actin* dargestellt. So konnte die Differenzierung der glattmuskulären Zellen aus den Mesenchymzellen um den Parabronchus und die Bildung der Muskulatur der Atrien nachvollzogen werden. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Basallamina, als Grenze zwischen Epithel und Mesenchym, Laminin auf elektronenmikroskopischen Niveau nachgewiesen und somit die Vorgänge an der Basallamina bei der Abflachung der sich bildenden Blut-Luft-Schranke näher untersucht.

Durch die bisher für den Hühnerembryo einmalige Kombination der verschiedenen ultrastrukturellen Untersuchungstechniken mit der Immunogoldtechnik konnte in dieser Arbeit ein wichtiger Beitrag zur Untersuchung der funktionellen und strukturellen Vorgänge bei der Bildung des Gasaustauschgewebes der Vögel gewonnen werden. Diese Untersuchungen zeigen das Potential des embryonalen Haushuhns als Modell und eröffnen neue Möglichkeiten, dieses Modell für weiterführende Untersuchungen auch für humanmedizinische Fragestellungen nutzbar zu machen.

## 8 Thesen

- I. Das Huhn ist ein zunehmend wichtiges Modell für die tierexperimentelle Forschung für den Menschen.
- II. Die Lunge der Vögel ist im Gasaustausch äußerst effizient. Dazu dient der außergewöhnliche Aufbau der Vogellunge und die Ausbildung einer besonders dünnen Blut-Luft-Schranke im Gasaustauschgewebe.
- III. Im Laufe der embryonalen Entwicklung der Vogellunge interagiert das Epithel der Parabronchien spezifisch mit dem umgebenden Mesenchym, um das Gasaustauschgewebe zu bilden. Die Untersuchung dieser Interaktionen kann somit als Modell für weitere epithelial-mesenchymale Systeme gelten.
- IV. Die Immunmarker Anti-E-Cadherin, Anti-SOX2, Anti-*alpha - smooth muscle actin* und Anti-Laminin können mittels der Immunogoldtechnik auf Ultradünnschnitten der embryonalen Lunge im Transmissionselektronenmikroskop sichtbar gemacht werden.
- V. Anti-E-Cadherin markiert spezifisch das E-Cadherin in den *Adhaerens junctions* und weiteren Zellkontakten des parabronchialen Epithels.
- VI. Anti-SOX2 weist den Transkriptionsfaktor SOX2 im Epithel und Mesenchym nach und erlaubt mittels elektronenmikroskopischer Auszählung des kolloidalen Goldes und Vermessung der subzellulären Flächen eine Aussage zu seiner quantitativen Verteilung im Entwicklungszeitraum von E10 bis E16 in den einzelnen Zellarten.
- VII. Die Differenzierung und Entwicklung der glatten Muskulatur der Atrien kann durch Markierung mittels Anti-*alpha - smooth muscle actin* verfolgt werden, welches spezifisch glattmuskuläres Aktin anzeigt.
- VIII. Das Laminin als Bestandteil der Basalmembran, welche als Grenze zwischen parabronchialen Epithel und Mesenchym gebildet wird, kann durch Anti-Laminin spezifisch sichtbar gemacht werden.

## Literaturverzeichnis

- Anderson-Berry, A.; O'Brien, E. A.; Bleyl, S. B.; Lawson, A.; Gundersen, N.; Ryssman, D. et al. (2005): Vasculogenesis drives pulmonary vascular growth in the developing chick embryo. *Dev. Dyn.* 233 (1), S. 145–153.
- Bertemes, H. (2012): *Analysis of mesenchymal and epithelial interactions in the lung of  $\gamma$ -Protocadherin-deficient mice and in chick embryonic lung cultures*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.
- Bezuidenhout, A. J. (2005): Light and electron microscopic study of the thoracic respiratory air sacs of the fowl. *Anat. Histol. Embryol.* 34 (3), S. 185–191.
- Bjørnstad, S.; Paulsen, R. E.; Erichsen, A.; Glover, J. C.; Roald, B. (2014): Type I and II pneumocyte differentiation in the developing fetal chicken lung. Conservation of pivotal proteins from birds to human in the struggle for life at birth. *Neonatology* 105 (2), S. 112–120.
- Brackenbury, R.; Urs R.; Gerald M. E. (1981): Distinct Calcium-Independent and Calcium-Dependent Adhesion Systems of Chicken Embryo Cells. *Dev. Biol.* (78), S. 387–391.
- Calvitti, M.; Baroni, T.; Calastrini, C.; Lilli, C.; Caramelli, E.; Becchetti, E. et al. (2004): Bronchial branching correlates with specific glycosidase activity, extracellular glycosaminoglycan accumulation, TGF beta(2), and IL-1 localization during chick embryo lung development. *J. Histochem. Cytochem.* 52 (3), S. 325–334.
- Carneiro, J.; Junqueira, L. C. U.; Schiebler, Th. H. (1996): *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 4. Aufl. Berlin: Springer.
- Collet, C. (2012): *Funktion des Transkriptionsfaktors SOX2 in Glioblastomen*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des doctor medicinae der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.
- Colliex, Ch.; Kohl, H. (2008): *Elektronenmikroskopie. Eine anwendungsbezogene Einführung*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Davenport, J. R. (2005): An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *AJP: Renal Physiology* 289 (6), F1159-F1169.
- Durbeej, M. (2010): Laminins. *Cell Tissue Res.* 339 (1), S. 259–268.
- Durbeej, M.; Ekblom, P. (1997): Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. *Exp. Lung Res.* 23 (2), S. 109–118.
- Ellis, E. A. (2014): No More Epon 812: This Product Does Not Exist Today. *Micros. Today* 22 (03), S. 50–53.
- Fechner, S. (2007): *Der Hühnerembryo als Modell für intrauterine, ultraschallgesteuerte Herzinterventionen*. Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhards-Karls-Universität zu Tübingen.
- Fernandes-Silvia, H.; Vaz-Cunha, P.; Baranauskaitė Barbosa, V.; Silva-Goncalves, C.; Correia-Pinto, J.; Moura, R. S. (2017): Retinoic acid regulates avian lung branching through a molecular network. *Cell. Mol. Life Sci* 74: 4599-4619.
- Feuerstein, M. (2012): *Monitoring der embryonalen Entwicklung von Geweben am Hühnchenmodell mittels Magnetresonanztomographie bei 7 Tesla*. Inaugural-

- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.
- Flegler, St. L.; Heckman, J. W.; Klomparens, K. L. (1995): *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Fry, A. M.; Leaper, M. J.; Bayliss, R. (2014): The primary cilium: Guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis* 10 (1), 48-47.
- Gall, T. M. H.; Frampton, A. E. (2013): Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *J. Clin. Pathol.* 66 (11), S. 928–932.
- Gallin, W. J.; Edelman, G. M.; and Cunningham, B. A. (1983): Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Dev. Biol.* (80), S. 1038–1042.
- Gerdes, J. M.; Davis, E. E.; Katsanis, N. (2009): The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell* 137 (1), S. 32–45.
- Glauert, A. M.; Lewis, P. R. (1998): *Biological specimen preparation for transmission electron microscopy*. London: Portland (Practical methods in electron microscopy, v. 17).
- Gleghorn, J. P.; Kwak, J.; Pavlovich, A. L.; Nelson, C. M. (2012): Inhibitory morphogens and monopodial branching of the embryonic chicken lung. *Dev. Dyn.* 241 (5), S. 852–862.
- Gontan, C.; Munck, A. de; Vermeij, M.; Grosveld, F.; Tibboel, D.; Rottier, R. (2008): Sox2 is important for two crucial processes in lung development: Branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev. Biol.* 317 (1), S. 296–309.
- Grant, M. M.; Cutts, N. R.; Brody, J. S. (1983): Alterations in lung basement membrane during fetal growth and type 2 cell development. *Dev. Biol.* 97 (1), S. 173–183.
- Gros, O.; Maurin, L. C. (2008): Easy flat embedding of oriented samples in hydrophilic resin (LR White) under controlled atmosphere: Application allowing both nucleic acid hybridizations (CARD-FISH) and ultrastructural observations. *Acta Histochemica* 110 (5), S. 427–431.
- Guillot, C.; Lecuit, T. (2013): Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis. *Science* 340 (6137), S. 1185–1189.
- Gunst, S. J.; Tang, D. D. (2000): The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur. Respir. J.* 15 (3), S. 600–616.
- Hamburger, V.; Hamilton, H. L. (1992): A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. Reprint 1992. *Dev. Dyn.* 195 (4), S. 231–272.
- Harris, J. R. (1991): *Electron microscopy in biology. A practical approach*. Oxford: IRL Press (The Practical approach series).
- Hawkins, H. K.; Rehm, L. S.; Zhu, J. Y. (1992): Colloidal gold labeling of sections and cell surfaces. *Ultrastruct. Pathol.* 16 (1-2), S. 61–70.
- Hempel, E. M. (2017): *Immunzytochemische Untersuchung der anterioren Luftsackentwicklung mit epithelialen und mesenchymalen Markern im embryonalen Haushuhn (Gallus gallus domesticus)*. Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin der Universitätsmedizin Rostock.

- Hermann, R.; Walther, P.; Müller, M. (1996): Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem. Cell Biol.* 106 (1), S. 31–39.
- Herrera, G. A. (1992): Ultrastructural immunolabeling: a general overview of techniques and applications. *Ultrastruct. Pathol.* 16 (1-2), S. 37–45.
- Herriges, M.; Morrisey, E. E. (2014): Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* 141 (3), S. 502–513.
- Hildebrand, M.; Goslow, G.; Distler, C. (2004): *Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere*. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Hohenester, E.; Yurchenco, P. D. (2013): Laminins in basement membrane assembly. *Cell. Adh. Migr.* 7 (1), S. 56–63.
- Horowitz, A.; Simons, M. (2008): Branching morphogenesis. *Circ. Res.* 103 (8), S. 784–795.
- Ishii, Y.; Rex, M.; Scotting, P. J.; Yasugi, S. (1998): Region-Specific Expression of Chicken Sox2 in the Developing Gut and Lung Epithelium: Regulation by Epithelial-Mesenchymal Interactions. *Dev. Dyn.* (213), S. 464–475.
- Jimoh, S. A.; Maina, J. N. (2012): Immuno-localization of type-IV collagen in the blood-gas barrier and the epithelial-epithelial cell connections of the avian lung. *Biology Letters* 9 (1), 20120951.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J.; Schiebler, T. H. (1996): *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. 4. Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Kim, H. Y.; Varner, V. D.; Nelson, C. M. (2013): Apical constriction initiates new bud formation during monopodial branching of the embryonic chicken lung. *Development (Cambridge, England)* 140 (15), S. 3146–3155
- Kim, S.; Dynlacht, B. D. (2013): Assembling a primary cilium. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (4), S. 506–511.
- Kolb, G.M. H. (1991): *Vergleichende Histologie. Cytologie und Mikroanatomie der Tiere*. Berlin: Springer-Verlag.
- Köpf-Maier, P.; Merker, H.-J (1989): *Atlas der Elektronenmikroskopie. Zellen, Gewebe, Organe*. Wien: Ueberreuter Wissenschaft.
- Kruegel, J.; Miosge, N. (2010): Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (17), S. 2879–2895.
- Kühnel, W. (2002): *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. 11. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kuphal, S. (2005): *Multipler Einfluß des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin auf Invasion und Metastasierung des malignen Melanoms*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Lang, G. (2006): *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Wien: Springer.
- Laybourne, R. C. (1974): Collision between a Vulture and an Aircraft at an Altitude of 37,000 Feet. *The Wilson Bulletin*, S. 461–462.

- Lecuit, T.; Yap, A. S. (2015): E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nature Cell Biology* 17 (5), S. 533–539.
- Li, L.; Hartley, R.; Reiss, B.; Sun, Y.; Pu, J.; Wu, D. et al. (2012): E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (16), S. 2779–2789.
- Lincoln, F. C. (1999): *Migration of Birds*. (No. 16) Washington DC: Government Printing Office.
- Lockard, V. G. (1992): A simple technique for postembedding ultrastructural immunogold labeling. *Ultrastruct. Pathol.* 16 (1-2), S. 47–50.
- Loscertales, M.; Mikels, A. J.; Hu, J. K.-H.; Donahoe, P. K.; Roberts, D. J. (2008): Chick pulmonary Wnt5a directs airway and vascular tubulogenesis. *Development (Cambridge, England)* 135 (7), S. 1365–1376.
- Lurdes P. de, M; Gonçalves, C.; Rodrigues, P.; Bairos, V. A. (2006): Quantification by image analysis of the Gallus gallus lung elastic fibres from embryonic to adult birds. *Anat. Histol. Embryol.* 35 (5), S. 293–298.
- Maina, J. N. (2000): What it takes to fly: the structural and functional respiratory refinements in birds and bats. *J. Exp. Biol.* 203 (Pt 20), S. 3045–3064.
- Maina, J. N. (2002): Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives. *Biological Reviews* 77 (1), S. 97–152.
- Maina, J. N. (2003a): Developmental dynamics of the bronchial (airway) and air sac systems of the avian respiratory system from day3 to day 26 of life: a scanning electron microscopic study of the domestic fowl, Gallus gallus variant domesticus. *Anat. Embryol.* 207 (2), S. 119–134.
- Maina, J. N. (2003b): A systematic study of the development of the airway (bronchial) system of the avian lung from days 3 to 26 of embryogenesis: a transmission electron microscopic study on the domestic fowl, Gallus gallus variant domesticus. *Tissue and Cell* 35 (5), S. 375–391.
- Maina, J. N. (2005): *The Lung-Air Sac System of Birds*. Berlin: Springer.
- Maina, J. N. (2006): Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone. *Biol. Rev.* 81 (04), S. 545.
- Maina, J. N. (2012): Comparative molecular developmental aspects of the mammalian- and the avian lungs, and the insectan tracheal system by branching morphogenesis: recent advances and future directions. *Front. Zool.* 9 (1), S. 16.
- Maina, J. N.; Africa, M. (2000): Inspiratory aerodynamic valving in the avian lung: functional morphology of the extrapulmonary primary bronchus. *J. Exp. Biol.* 203 (Pt 18), S. 2865–2876.
- Maina, J. N.; Jimoh, S. A. (2013): Structural failures of the blood-gas barrier and the epithelial-epithelial cell connections in the different vascular regions of the lung of the domestic fowl, Gallus gallus variant domesticus, at rest and during exercise. *Biology Open* 2 (3), S. 267–276.

- Maina, J. N.; Jimoh, S.A.; Hosie, M. (2010): Implicit mechanistic role of the collagen, smooth muscle, and elastic tissue components in strengthening the air and blood capillaries of the avian lung. *J. Anat.* 217 (5), S. 597–608.
- Maina, J. N.; Madan, A. K.; Alison, B. (2003): Expression of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in early stages (days 3-11) of the development of the avian lung, *Gallus gallus* variant domesticus: an immunocytochemical study. *J. Anat.* 203 (5), S. 505–512.
- Maina, J. N.; West, J. B. (2005): Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol. Rev.* 85 (3), S. 811–844.
- Makanya, A. N.; Djonov, V. (2008): Development and spatial organization of the air conduits in the lung of the domestic fowl, *Gallus gallus* variant domesticus. *Microsc. Res. Tech.* 71 (9), S. 689–702.
- Makanya, A. N.; Djonov, V. (2009): Parabronchial angioarchitecture in developing and adult chickens. *J. Appl. Physiol.* 106 (6), S. 1959–1969.
- Makanya, A. N.; Hlushchuk, R.; Baum, O.; Velinov, N.; Ochs, M.; Djonov, V. (2007): Microvascular endowment in the developing chicken embryo lung. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 292 (5), L1136-L1146.
- Makanya, A. N.; Hlushchuk, R.; Djonov, V. (2011a): The pulmonary blood–gas barrier in the avian embryo: Inauguration, development and refinement. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 178 (1), S. 30–38.
- Makanya, A. N.; Hlushchuk, R.; Duncker, H. -R.; Draeger, A.; Djonov, V. (2006): Epithelial transformations in the establishment of the blood–gas barrier in the developing chick embryo lung. *Dev. Dyn.* 235 (1), S. 68–81.
- Makanya, A. N.; Koller, T.; Hlushchuk, R.; Djonov, V. (2012): Pre-hatch lung development in the ostrich. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 180 (2-3), S. 183–192.
- Makanya, A.; Anagnostopoulou, A.; Djonov, V. (2013): Development and Remodeling of the Vertebrate Blood-Gas Barrier. *BioMed Research International* 2013 (6), S. 1–15.
- Makanya, A.N.; El-Darawish, Y.; Kavoi, B. M.; Djonov, V. (2011b): Spatial and functional relationships between air conduits and blood capillaries in the pulmonary gas exchange tissue of adult and developing chickens. *Microsc. Res. Tech.* 74 (2), S. 159–169.
- Matsushita, S.; Urase, K.; Komatsu, A.; Scotting, P. J.; Kuroiwa, A.; Yasugi, S. (2008): Foregut endoderm is specified early in avian development through signal(s) emanating from Hensen's node or its derivatives. *Mech. Dev.* 125 (5-6), S. 377–395.
- Metzger, R. J.; Klein, O. D.; Martin, G. R.; Krasnow, M. A. (2008): The branching programme of mouse lung development. *Nature* 453 (7196), S. 745–750.
- Miura, T.; Hartmann, D.; Kinboshi, M.; Komada, M.; Ishibashi, M.; Shiota, K. (2009): The cyst-branch difference in developing chick lung results from a different morphogen diffusion coefficient. *Mech. Dev.* 126 (3-4), S. 160–172.
- Morrisey, E. E.; Hogan, B. L. M. (2010): Preparing for the First Breath: Genetic and Cellular Mechanisms in Lung Development. *Dev. Cell* 18 (1), S. 8–23.

- Moura, R. S.; Carvalho-Correia, E.; daMota, P.; Correia-Pinto, J. (2014): Canonical Wnt Signaling Activity in Early Stages of Chick Lung Development. *PLoS One* 9(12): e112388.
- Moura, R. S.; Coutinho-Borges, J. P.; Pacheco, A. P.; Damota, P. O.; Correia-Pinto, J. (2011): FGF signaling pathway in the developing chick lung: expression and inhibition studies. *PloS one* 6 (3), e17660.
- Moura, R. S.; Silva-Gonçalves, C.; Vaz-Cunha, P.; Correia-Pinto, J. (2016): Expression analysis of Shh signaling members in early stages of chick lung development. *Histochem Cell Biol* 146: 457–466.
- Müller, W.A.; Hassel, M. (2006): *Entwicklungsbiologie*. 4. Aufl. Berlin: Springer.
- Nasdala, I.; Wolburg-Buchholz, K.; Wolburg, H.; Kuhn, A.; Ebnet, K.; Brachtendorf, G.; Samulowitz, U.; Kuster, B.; Engelhardt, B.; Vestweber, D.; Butz, S. (2002): A Transmembrane Tight Junction Protein Selectively Expressed on Endothelial Cells and Platelets. *J. Biol. Chem.* 277 (18), S.16294-16303.
- Newman, G. R.; Hobot, J. A. (1999): Resins for combined light and electron microscopy: A half century of development. Review. *The Histochemical Journal* (31), S. 495–505.
- Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (1992): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band V. Anatomie der Vögel*. 2. Aufl. Berlin und Hamburg: Paul Parey.
- Nollet, F.; Kools, P.; van Roy, F. (2000): Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299 (3), S. 551–572.
- Pokutta, S.; Weis, W. I. (2007): Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23 (1), S. 237–261.
- Polak, J. M.; van Noorden, S. (1997): *Introduction to immunocytochemistry*. 2nd ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers; Springer (Royal Microscopical Society microscopy handbooks, 37).
- Rau, K. (2011): *Histologische Untersuchungen zur Expression molekularer Marker und beteiligter Signalwege bei der Lungenentwicklung im Hühnchen*. Bachelorarbeit. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg. Institut für Biologie I (Zoologie).
- Rawlins, E. L. (2011): The building blocks of mammalian lung development. *Dev. Dyn.* 240 (3), S. 463–476.
- Reinke A.; Frank M. (2018): *Electron microscopic analysis of ciliogenesis in multiciliary cells of the tracheal epithelium in the chicken embryo*“ Abstract und Poster zur Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft 2018 in Rostock.
- Reynolds, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 (1), S. 208–212.
- Roy, F. van (2014): Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature reviews. Cancer* 14 (2), S. 121–134.
- Sakiyama, J.; Yokouchi, Y.; Kuroiwa, A. (2000): Coordinated expression of Hoxb genes and signaling molecules during development of the chick respiratory tract. *Dev. Biol.* 227 (1), S. 12–27.
- Sakiyama, J.-I. (2003): Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development* 130 (7), S. 1225–1234.

- Salomon, F.-V. (1993): *Lehrbuch der Geflügelanatomie*. Jena: G. Fischer.
- Salvi, E.; Renda, T. (1992): An immunohistochemical study on neurons and paraneurons of the pre- and post-natal chicken lung. *Arch. Histol. Cytol.* 55 (2), S. 125–135.
- Sannes, P. L.; Wang, J. (1997): Basement membranes and pulmonary development. *Exp. Lung Res.* 23 (2), S. 101–108.
- Scheuermann, D. W.; Klika, E.; De Groot-Lasseel, M H; Bazantova, I.; Switka, A. (1997): An electron microscopic study of the parabronchial epithelium in the mature lung of four bird species. *Anat Rec.* 249 (2), S. 213–225.
- Schuger, L. (1997): Laminins in lung development. *Exp. Lung Res.* 23 (2), S. 119–129.
- Skalli, O.; Pelte, M. F.; Peclet, M. C.; Gabbiani, G.; Gugliotta, P.; Bussolati, G. et al. (1989): Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J. Histochem. Cytochem.* 37 (3), S. 315–321.
- Skalli, O.; Ropraz, P.; Trzeciak, A.; Benzonana, G.; Gillessen, D.; Gabbiani, G. (1986): A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin. A new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 103 (6 Pt 2), S. 2787–2796.
- Skepper, J. N.; Powell, J. M. (2008): Immunogold Staining Following Freeze Substitution and Low Temperature Embedding after Chemical Fixation or after Cryoimmobilization for Transmission Electron Microscopy (TEM). *Cold Spring Harbor Protocols* 2008 (6), pdb.prot5017. DOI: 10.1101/pdb.prot5017.
- Sobol, M.; Nebesářová, J.; Hozák, P. (2011): A method for preserving ultrastructural properties of mitotic cells for subsequent immunogold labeling using low-temperature embedding in LR White resin. *Histochem Cell Biol* 135 (1), S. 103–110.
- Sobol, M.; Philimonenko, V. V.; Hozák, P. (2010): Comparison of methods of high-pressure freezing and automated freeze-substitution of suspension cells combined with LR White embedding. *Histochem Cell Biol* 134 (6), S. 631–641.
- Starck, D. (1982): *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere auf evolutionsbiologischer Grundlage*. Berlin: Springer.
- Stephens, N. L. (2001): Airway Smooth Muscle. *Lung* 179 (6), S. 333–373.
- Stirling, J. W. (1990): Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labeling and preparation techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 38 (2), S. 145–157.
- Swarr, D.T.; Morrisey, E. E. (2015): Lung Endoderm Morphogenesis: Gasping for Form and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31: 553–573.
- Takeichi, M. (1988): The cadherins. Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102 (4), S. 639–655.
- Theveneau, E.; Mayor, R. (2012): Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 24 (5), S. 677–684.
- Vaccaro, R.; Parisi Salvi, E.; Renda, T. (2006): Early development of chick embryo respiratory nervous system: an immunohistochemical study. *Anat. Embryol.* 211 (5), S. 345–354.
- Walsh, C.; McLelland, J. (1978): The development of the epithelium and its innervation in the avian extra-pulmonary respiratory tract. *J. Anat.* 125 (Pt 1), S. 171–182.

- Wang, N.; Banzett, R. B.; Nations, Ch. S.; Jenkins, F. A. (1992): An aerodynamic valve in the avian primary bronchus. *J. Exp. Zool.* 262 (4), S. 441–445.
- Warburton, D. (2008): Order in the lung. *Nature* (453), S. 733–735.
- Welsch, U. (1994): Histologie: *Farbatlas der mikroskopischen Anatomie / Sobotta; Hammersen.* - 4., neubearbeitete Auflage München: Urban & Schwarzenberg
- West, J. B.; Fu, Z.; Deerinck, Th. J.; Mackey, M. R.; Obayashi, J. T.; Ellisman, M. H. (2010): Structure-function studies of blood and air capillaries in chicken lung using 3D electron microscopy. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 170 (2), S. 202–209.
- West, J. B.; Watson, R. R.; Fu, Z. (2006): The honeycomb-like structure of the bird lung allows a uniquely thin blood-gas barrier. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 152 (1), S. 115–118.
- Westheide, W.; Rieger, R. M.; Rieger, G.; Goldschmid, A. (2010): *Spezielle Zoologie.* 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Liebner, S.; Engelhardt, B. (2001): Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci. Lett* 307, S. 77-80.
- Wolpert, L. (op. 2011): *Principles of development.* 4th ed. New York: Oxford University Press.
- Woodward, J. D.; Maina, J. N. (2008): Study of the structure of the air and blood capillaries of the gas exchange tissue of the avian lung by serial section three-dimensional reconstruction. *J Microsc* 230 (Pt 1), S. 84–93.
- Yamamoto, Y.; Kubota, T.; Atoji, Y.; Suzuki, Y. (1996): Distribution of alpha-vascular smooth muscle actin in the smooth muscle cells of the gastrointestinal tract of the chicken. *J. Anat.* 189 (Pt 3), S. 623–630.
- Yu, J.; Vodyanik, M. A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J. L.; Tian, S. et al. (2007): Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318 (5858), S. 1917–1920.
- Zihni, C.; Mills, C.; Matter, K.; Balda, M. S. (2016): Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17, S. 564–580.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti-
$\mu\text{m}$	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Ad	Area densa
Ai	Arteria interparabronchiales
Aj	Adherens junction
Ap	Aposom
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
At	Atrium
aZ	apikale Zellmembran
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
Bm	Basalmembran
Bmp4	bone morphogenetic protein 4
CWF	cold water fish gelatin, Kaltwasserfischgelatine
Db	Dense bands
DMP	2,4,6,-Tris(methylaminomethyl)phenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E“n“	Entwicklungsstadien nach“ n“ Tagen Bebrütung
Ecad	E-Cadherin
Em	Endomysium
EM-PBS	steril gefilterte Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
EMZ	Elektronenmikroskopisches Zentrum der Universität Rostock
En	Endothel
EnBm	endotheliale Basalmembran
Ep	Epithel
EpBm	epitheliale Basalmembran
Er	Erythrozyt
et al.	Et alii (und andere/Kollegen)
f.	und die folgende (Seite)
ff.	und die folgenden (Seiten)
FGF	Fibroblast growth factor/Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	Fibroblast growth factor Rezeptor
GA	Glutardialdehyd
gM	Glatte Muskulatur
HMG	high mobility group
Hoxb	Homeobox B
In	Infundibulum
It	Interzellularraum

---

L-CAM	Liver cell adhesive molecule
LIN 28	cell lineage abnormal 28-Entwicklungsgen
LR White	LR White Resin
Ls	Luftsack
Lu	Lumen
Me	Mesenchym
Mi	Mitochondrium
mm	Millimeter
MNA	Methylnadicanhydride
MW	Molekulargewicht in g/mol
NANOG	Tír na nÓg, dem "Land der ewigen Jugend" - Transkriptionsfaktor
NaP-Puffer	Natriumphosphatpuffer
Nkx2.1	Homöobox-Gen NK2 homeobox 1
nm	Nanometer
OCT4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
Or	Zellorganellen
Pa	Punctum adhaerens
Pb	Parabronchus
PBS	phosphat-buffered saline, Phosphat gepufferte isotonische Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pS	interparabronchiale Septen
Ras	Rat sarcoma
S.	Seite
sB	sekundärer Bronchus
Sc	Sulci costales
Shh	sonic hedgehog
sma	alpha-smooth muscle actin, Glattmuskuläres alpha-Aktin
SOX2	Transkriptionsfaktor sex determining region y – HMG box 2
SpB	Surfactant Protein B
Tbx4	T-box transcription factor 4
Tj	Tight junctions
Tp	Tori pulmonales
Tr	Trachea
TTF1	Thyroidale Transkriptionsfaktor 1
Ve	Vesikel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vi	Vena interparabronchiales
Wnt	Wingless integrated protein
Zi	Zilie
Zk	Zellkern

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lupenmikroskopische Aufnahme einer linken Hühnerlunge im Entwicklungsstadium E14 .....	3
Abbildung 2: Schematisierte und idealisierte Darstellung eines Querschnittes durch die Vogellunge, links einen Mediodorsobronchus, rechts einen Medioventrobronchus treffend .....	4
Abbildung 3: Schematisierte Darstellung der Bronchien anhand eines kranialen und eines kaudalen Querschnittes einer rechten Lunge .....	5
Abbildung 4: Histologischer Querschnitt durch einen Parabronchus .....	6
Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der Luftströmungen beim Atemvorgang der Vögel .....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Umwandlungsprozesse des Epithels des Gasaustauschgewebes.....	17
Abbildung 7: Schema einiger Signaltransduktionswege der frühen Lungenentwicklung bei der Maus .....	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expression von Hoxb-Genen in der embryonalen Lungenentwicklung der Hühner .....	21
Abbildung 9: Anti-Ecad-Markierung der Zellkontakte des Epithels eines Parabronchus auf einem Paraffinschnitt einer Hühnerlunge im Entwicklungsstadium E10....	25
Abbildung 10: Anti-SOX-Markierung der Zellen des Epithels und des Mesenchyms eines Parabronchus auf einem Paraffinschnitt einer Hühnerlunge im Stadium E12 .....	27
Abbildung 11: Anti-alpha-sma-Markierung der glattmuskulären Mesenchymzellen der atrialen Muskulatur eines Parabronchus .....	29
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Übersicht der parabronchialen Wachstumsmuster bei den Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16 .....	42
Abbildung 13: Aufeinanderzuwachsen der Parabronchien beim Stadium E10 .....	43
Abbildung 14: Struktur der Parabronchien im Entwicklungszeitraum E10 bis E16 Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie im Vergleich .....	44
Abbildung 15: Übergang eines kranialen Luftsackansatzes in einen Bronchus beim Entwicklungsstadium E8 .....	47
Abbildung 16: Aufbau der Wand eines kaudaler Luftsackes beim Entwicklungsstadium E14. ....	48

---

Abbildung 17: Übersicht über die Strukturen eines Parabronchus bei dem Entwicklungsstadium E10 von apikal nach basal.....	50
Abbildung 18: Aufbau eines Parabronchus bei den Entwicklungsstadien E12 und E14.....	53
Abbildung 19: Aufbau eines Parabronchiums beim Entwicklungsstadium.....	56
Abbildung 20: Aufbau der sich bildenden Blut-Luft-Schranke .....	57
Abbildung 21: Umwandlungsvorgänge des Epithels der Parabronchien zur Bildung der Blut-Luft-Schranke .....	59
Abbildung 22: Zilien in den embryonalen Epithel- und Mesenchymzellen .....	60
Abbildung 23: Kontakte zwischen Epithelzellen und Mesenchymzellen .....	62
Abbildung 24: Apikale Zellkontakte des Epithels im Vergleich Struktur und Anti-E-Cadherin-Markierung. ....	64
Abbildung 25: Strukturelle und Anti-E-Cadherin-markierte Aufnahmen von Zellkontaktstellen im Vergleich .....	66
Abbildung 26: Mit Anti-SOX2-Immunogold markierte Epithel- und Mesenchymzellen der Entwicklungsstadien E10, E12 und E16 .....	68
Abbildung 27: Glatte Muskulatur im transelektronenmikroskopischen, rasterelektronenmikroskopischen und Anti-alpha-sma-Immunogold-markierten Aufnahmen im Vergleich .....	71
Abbildung 28: Vergleich der ultrastrukturellen und Anti-alpha-sma-markierten Aufnahmen der glatten Muskelzellen bei den Entwicklungsstadien E10 bis E16 .....	72
Abbildung 29: Vergleich von strukturellen und Anti-Laminin-Immunogold-markierten Aufnahmen der Basalmembran bei den Entwicklungsstadien E10 bis E16.....	76

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Prozentualer Anteil der Anti-SOX2-Imunogoldkörnern auf den Zellkernen der verschiedenen Zellarten .....	69
Diagramm 2: Prozentualer Anteil der Anti-SOX2-Imunogoldkörnern auf den Zellkernen der verschiedenen zusammengefassten Zellarten.....	70

---

## Anhangsverzeichnis

Vorversuche .....	XVII
Verzeichnis der Antikörper .....	XVIII
Verzeichnis der Materialien .....	XIX
Verzeichnis der Chemikalien .....	XXI
Verzeichnis der Geräte .....	XXIV
Verzeichnis der Protokolle .....	XXVI
Protokolle .....	XXVIII
Statistische Ergebnisse der quantitativen Anti-SOX-Immunogold-Untersuchung .....	XLIV
Lebenslauf .....	XLIX
Selbstständigkeitserklärung .....	L

## Vorversuche

Die Protokolle zu diesen Vorversuchen sind in dieser Arbeit nicht veröffentlicht und können bei der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Frank angefordert werden.

In Vorversuchen wurde LR White mittleren und hohen Härtegrades verglichen. Es wurde sowohl eine Einbettung in Flachbettformen abgedichtet mit ACLAR-Folie als auch in BEEM® Kapseln versucht. Eine Aushärtung des LR White bei Raumtemperatur oder 0 Grad Celsius mittels UV-Licht wurde ausprobiert. Die Versuche mit UV-Licht erfolgten im Gefriersubstitutions- und Tieftemperatureinbettungssystem AFS2 von Leica. Die in LR White eingebetteten Proben für die Immunmarkierungen wurden in Vorversuchen auf mit Pioloform befilmte 50 bis 100 mesh Nickelgrids aus dem Wasserbad des Diamantmessers aufgefangen.

Bei der Einbettung mit LR White sollten Plastikgefäße vermieden werden, da diese angelöst werden und mit dem Harz interagieren. Da sich LR White in Ethanol löst, sollte dieses auch beim Kontrastieren vermieden werden. LR White ist nicht für die UV Aushärtung bei niedrigen Temperaturen geeignet, auch muss sehr auf einen konsequenten Luftausschluss beim Polymerisieren von LR White geachtet werden. Eine Aushärtung im UV-Licht bei Raumtemperatur gelang in Gelatine kapseln. Ein Film kann die Erkennbarkeit der Ultrastruktur im LR White weiter herabsetzen und wird bei engmaschigen Netzen nicht benötigt.

Für die Färbung mit *Anti-alpha-smooth muscle actin*-Antikörpern wurden verschiedene Protokolle und Varianten ausgetestet. Eine Variante war ein Quenching Schritt vor dem Protein Block-Puffer. Dies dient dem Löschen freier Aldehydgruppen, die durch die Fixierung ins Gewebe kommen und soll die Hintergrundfärbung reduzieren. Dazu wurde eine 0,1%ige Borax in PBS Lösung und eine 50 mM Glycin in PBS Lösung getestet. Ein weiterer Versuch war, den Blocking-Puffer mit weiteren Proteinmischungen zu ergänzen. Dazu wurde 1% Perfect-Block™ zugesetzt, beziehungsweise 0,1% BSA-c. BSA-c von Aurion, Wageningen, Niederlande, ist ein acetyliertes, teilweise linearisiertes Rinderserumalbumin. Durch seine negativ geladenen Moleküle belegt es positiv geladene Orte der Probe, die nun nicht mehr mit negativ geladenen Antikörpern oder kolloidalem Gold interagieren können (Firmeninfo von Aurion). Perfect-Block™ von MoBiTec sind aufgereinigte Gelatineproteine (Firmeninfo von MoBiTec). Da eine Verdünnung des Primären Antikörpers mit 1:1000 und der Zugabe von 1% Perfect-Block™ zum Blocking-Puffer die besten Resultate ergab, wurde das angegebene Protokoll 28 genutzt.

## Verzeichnis der Antikörper

### Primäre Antikörper

#### Anti-E-Cadherin

Purified Mouse Monoclonal  
Material Number: 610181  
Lot Number: 20080  
BD Bioscience, Erembodegem, Belgien

#### Anti-SOX2

Purified Rabbit Polyclonal  
Clone: AB5603  
Lot Number: 1956419  
EMD Millipore Corporation, Temecula California, USA

#### Anti-Aktin, $\alpha$ -Smooth Muscle

Purified Mouse Monoclonal  
Clone: 1A4  
Product Number: A5228  
Lot Number: 073M4768V  
Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

#### Anti-Laminin

Antibody produced in rabbit, affinity isolated  
Product Number: L9393  
Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

### Sekundäre Antikörper

#### Goat-Anti-Mouse IgG 10 nm

Immunogold conjugate  
Product Number: GAM 10 nm  
BBInternational solutions, USA

#### Goat-Anti-Rabbit IgG 10 nm

Immunogold conjugate  
Product Number: GAR 10 nm  
BBInternational solutions, USA

#### Goat-Anti-Rabbit IgG 15 nm

Immunogold conjugate  
Lot Number: GAR-00401/1  
AURION, PD Wageningen, The Netherlands

## Verzeichnis der Materialien

### **300 mesh Kupfergrids square mesh**

Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

### **400 mesh Nickel hexagonal Dünnsteggrids**

Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

### **Antimagnetische Pinzetten**

Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

### **Deckgläser für die Mikroskopie**

Menzel-Gläser

Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

### **Diamantmesser**

ultra, 45°, 3mm

Diatome AG, Biel, Schweiz

### **„Falcon-Tubes“ Röhrchen, 15 ml, CELLSTAR®**

PP, 17/120 mm, konischer Boden, Schraubverschluss blau, graduiert, Schriftfeld, steril

Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

### **Flacheinbettform**

Flache Einbettungsgießform „AGAR Scientific Ltd“

Plano GmbH Wetzlar, Deutschland

### **Gelatinekapseln**

Größe 1

Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

### **Glaspipette mit Gummiballon und Verschlüssen**

Staining Pipettes, flow-limiting Plugs and Bulbs

TED Pella, Inc., Redding, USA

### **Kunststoffspritze mit Gummidichtung 50 ml [Blei]**

Injectomat-Spritze 50 ml – mit Kanüle

Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland

### **Mikrotiterplatte und –deckel, CELLSTAR®,**

Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, transparent, TC, Abdeckplatte mit

Kondensationsringen, steril

Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

### **Millex GP Filter Unit 0.22 µm**

Millipore Express PES Membrane

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Objektträger HistoBond®**

adhäsive, silanisierte Oberflächen; Kanten geschliffen beidseitiger Mattrand  
Paul Marienfeld GmbH Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

**Parafilm „M“ ®**

Laboratory Film  
Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

**Pasteurpipetten PE-LD**

Einmalpipetten  
BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland

**PELCO SynapTek GridStick™**

TED PELLA, INC, Redding, Californien, USA  
bezogen über Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

**Perfekt Loop/Perfekt-Kescher®**

für Ultramikrotomie  
Agar Scientific  
bezogen über Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

**pH-Messpapier/Indikatorstäbchen 7.0 – 14.0**

Macherey-Nagel, Art. Nr. C732.2  
Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**PLANO TEMPFIX**

Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

**Rasierklingen**

Kohlenstoffstahl, einseitig geschliffen  
single edge industrial blades  
Pat. No. 4,218,204; 94-109-11-CGI  
Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

**Rollrandgläser, Kalk-Soda-Glas mit Schnappdeckel**

Höhe 40 mm, 5 ml, Artikel: X654.1  
Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Sterile Kunststoffspritze 10, 20, 50 ml**

BD Discardit II  
Modulware, Sortiment der Unimedizin Rostock, Deutschland

**Stiftprobenteller für Rasterelektronenmikroskope**

aus Aluminium  
Plano GmbH Elektronenmikroskopie, Wetzlar, Deutschland

**„Zentrifugenröhrchen“ / „Eppis“**

Multi®-Sicherheitsreaktionsgefäße  
Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Verzeichnis der Chemikalien

### 1,2-Dichlorethan

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>Rotipuran® ≥99,5%, p.a., MW: 98,96  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### Aceton

Analytical Reagent  
LAB-SCAN analytical science, Gliwice, Polen

### Argon

AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland

### Azur II

(C.I.52010/52015)  
for microscopy (contains Methylene blue)  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### Blei(II)nitrat

zur Analyse  
Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MW: 331,20  
VEB Laborchemie Apolda, Deutsche Demokratische Republik

### Borax (Dinatriumtetraborat-Decahydrat)

Zentralapotheke des Universitätsklinikums Rostock, 10.12.1970

### BSA fraction V

Albumin aus Rinderserum, BSA  
lyophilized powder, ≥ 96%  
Lot # 051M1875V  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### BSA-cTM

Bovine Serum Albumin 10%ig  
AURION, PD Wageningen, The Netherlands

### CWF-Gelatine, Fish Gelatin

BATCH 12488  
BBInternational, USA

### DDSA, 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid pract.

C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>, MW: 266,4  
Epon-Härter  
Serva Feinchemica Heidelberg/New York, Deutschland

### DMP-30, 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol pract.

C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O, MW: 265,4  
Epon-Beschleuniger  
Serva Feinchemica Heidelberg/New York, Deutschland

### Epon 812 pract.

MW: ca. 306  
Serva Feinchemica Heidelberg/New York, Deutschland

**Ethanol**

absolut, unvergällt

Universität Rostock, Zentralapotheke des Klinikums, Rostock, Deutschland

**Glutardialdehydlösung 25%**

für die Elektronenmikroskopie

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Glycin**

Glycerol

Rotipuran® ≥99,5%, p.a., wasserfrei

C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, MW: 92,09

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Grid Stick Adhesive**

Cat. No. 155-9

TED PELLA, INC, Redding, Californien, USA

**Kaliumchlorid**

KCl, MW: 74,56

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Kaliumdihydrogenphosphat**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MW: 136,09

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Kohlendioxid**

AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland

**LR White Resin**

Medium Grade Acrylic Resin

500g

Contains 5ppm hydroquinone

London Resin Company Ltd

Reading, Berkshire, England

**Methylenblau**

Indikator (C.I. Nr. 52015)

für die Mikroskopie

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>3</sub>S \* H<sub>2</sub>O, MW: 355,89

Ferak, Laborant GmbH, Berlin (West), Deutschland

**MNA, Methylnadicanhydrid pract. (Methylenedomethylene tetrahydrophthalic anhydride)**C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, MW: 178,2

Epon-Härter

Serva Feinchemica Heidelberg/New York, Deutschland

**Natriumchlorid**

NaCl, MW: 58,44

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Natriumcitrat-2-hydrat**

reinst zur Analyse

Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> \* H<sub>2</sub>O; MW: 294,10

VEB Laborchemie Apolda, Deutsche Demokratische Republik

**Natriumhydroxid**

NaOH, MW: 40,00

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Natriumphosphat, primäres; Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O, MW: 137,99

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Natriumphosphat, sekundäres; Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, MW: 177,99

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Normal Goat Serum**

Cat No: B11-035

Lot No: B03511-7019

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

**Osmiumtetroxid**OsO<sub>4</sub>

Batch No. 081046

Johnson Matthey Chemicals Limited

Royston, Hertfordshire, England

**Ovalbumin Grade V**

Albumin, from chicken egg white, Ovalbumin

lyophilized powder, ≥ 98%

Lot # 080M7012V

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

**Paraformaldehyd (Pulver)**reinst (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Perfect-Block<sup>TM</sup>**

MoBiTec, Goettingen, Germany

**Roti<sup>®</sup>-Histokitt**

synthetisches Einschlussmittel, für die Histologie

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Stickstoff, flüssig**

AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland

**Trichlormethan, Chloroform**CHCl<sub>3</sub> ≥99%, zur Synthese, MW: 119,38

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Tween<sup>®</sup> 20**

Art. 9127.1

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Uranylacetat Dihydrat**

(Depleted Uranium) Reagent A.C.S.

UO<sub>2</sub> (OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> \* H<sub>2</sub>O, MW: 424,15

TED PELLA INC, Redding, USA

---

## Verzeichnis der Geräte

### Abzug

Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland

### Brüter HEKA – Turbo 168

HEKA – Brutgeräte, Rietberg, Deutschland

### Brutschrank „Memmert“

MEMMERT GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

### Feldemissionsrasterelektronenmikroskop Merlin VP compact

Baujahr 2014

Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

### Fotosoftware Axioskop und AxioCam – ZEN 2012 (blue edition)

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

### Heizplatte - Objektträger-Streichtisch OTS 40

MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland

### Kamera TEM 902 Slow-scan CCD Kamera

Typ: TH 7888, Serie Nr. 177/01

Fa. Proscan elektronische Systeme GmbH, Lagerlechfeld, Deutschland

### Detektor am Feldemissionsrasterelektronenmikroskop

HE-SE2

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

### Kritisch Punkt Trockner

EMITECH K850

Röntgenanalytik Messtechnik GmbH, Taunusstein, Deutschland

### Lichtmikroskop Zeiss Axioskop 40

Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

### Lichtmikroskopkamera AxioCam Erc 5s

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

### Lichtmikroskopkamera ProgRes C10

Jenoptik, Laser,Optik,Systeme GmbH, Jena, Deutschland

### Pipetten, mechanisch

Discovery Comfort von PZ HTL S.A., Warschau, Polen

Eppendorf Reference von Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

### Rührer

Rotilabo®-magnetic stirrer with heating MH 20

Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Schwenker – Vibramax**

Heidolph Instruments GmbH & CO., Schwabach, Deutschland

**Software TEM 902: iTEM**

analySIS Image Processing  
Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland

**Sputter-/Bedampfungsanlage**

BAL-TEC SCD 004  
BALZERS UNION Limited, Balzers, Liechtenstein

**Stereomikroskop/Binokular Olympus SZX10**

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

**Tischzentrifuge Micro Star 17**

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Transmissionselektronenmikroskop**

Typ EM902  
Baujahr 1992  
Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

**Trimmfräse**

Leica EM TRIM2  
Leica Mikrosysteme GmbH, Wien

**Ultramikrotom**

Leica EM UC7 RT  
Leica Mikrosysteme GmbH, Wien

**Vortexer**

Unimag ZX3  
UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg, Deutschland

**Zentrifuge**

Universalzentrifuge HERAEUS® MEGAFUGE® 1.0/1.0 R  
Laborgeräte München, München, Deutschland

## Verzeichnis der Protokolle

Protokoll 1: 10xPBS – phosphate-buffered Saline Grundlösung.....	XXVIII
Protokoll 2: PBS – phosphate-buffered Saline.....	XXVIII
Protokoll 3: NaP-Puffer/Natriumphosphat-Puffer, 0,1 M, pH 7,3 .....	XXVIII
Protokoll 4: Natronlauge .....	XXVIII
Protokoll 5: Paraformaldehyd Fixativ – 4% PFA in PBS .....	XXIX
Protokoll 6: Paraformaldehyd und Glutaraldehyd Fixativ – 1% PFA, 2% GA in PBS .....	XXIX
Protokoll 7: 1% Osmiumtetroxidlösung.....	XXX
Protokoll 8: Acetonreihe, 30%ig, 50%ig, 70%ig, 90%ig.....	XXX
Protokoll 9: Ethanolreihe, 30%ig, 50%ig, 75%ig, 90%ig.....	XXX
Protokoll 10: Eponansatz .....	XXXI
Protokoll 11: Einbettung in Epon.....	XXXI
Protokoll 12: Einbettung in LR White .....	XXXII
Protokoll 13: Richardson-Färbelösung.....	XXXII
Protokoll 14: Uranylacetat in Ethanol, ca. 7%ig, gesättigt .....	XXXIII
Protokoll 15: Uranylacetat für Immunolabeling .....	XXXIII
Protokoll 16: Bleicitrat nach Reynolds .....	XXXIII
Protokoll 17: Kontrastieren von Epon-Ultradünnschnitten.....	XXXIV
Protokoll 18: Kontrastieren von LR White-Ultradünnschnitten .....	XXXV
Protokoll 19: NaP-Puffer 0,2 M, pH 7,4 .....	XXXV
Protokoll 20: EM-PBS .....	XXXVI
Protokoll 21: EM-Puffer.....	XXXVI
Protokoll 22: Blocking-Puffer.....	XXXVII
Protokoll 23: PBS Glycin Lösung 50 mM .....	XXXVII
Protokoll 24: Blocking-Puffer mit 1% Perfect-Block .....	XXXVII
Protokoll 25: Immunogoldstaining Grundprotokoll.....	XXXVIII
Protokoll 26: Immunogoldstaining Anti-E-Cadherin.....	XXXIX

---

Protokoll 27: Immunogoldstaining Anti-SOX2 .....	XL
Protokoll 28: Immunogoldstaining Anti-alpha-smooth muscle actin .....	XL
Protokoll 29: Immunogoldstaining Anti-Laminin.....	XLI
Protokoll 30: Kritisch-Punkt-Trocknung .....	XLI
Protokoll 31: Besputtern.....	XLII

## Protokolle

### Protokoll 1: 10xPBS – phosphate-buffered Saline Grundlösung

Material:

80	g	NaCl	Natriumchlorid, (MW: 58,44)
2	g	KCl	Kaliumchlorid, (MW: 75,56)
15,65	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	sekundäres Natriumphosphat Dihydrat, (MW: 177,99)
2	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat, (MW: 136,09)
ad 1	l	Aqua dest.	

Durchführung:

- (1) Salze abwiegen und unter rühren lösen.
- (2) Mit Aqua dest. auf 1l auffüllen.
- (3) Bei Aufbewahrung im Kühlschrank kann es zu Kristallbildungen kommen, die vor der weiteren Verwendung wieder gelöst werden müssen.

### Protokoll 2: PBS – phosphate-buffered Saline

Material:

100	ml	10xPBS (Protokoll 1)
ad 1	l	Aqua dest.

Durchführung:

- (1) 10xPBS abmessen und mit Aqua dest. auf 1l auffüllen.

### Protokoll 3: NaP-Puffer/Natriumphosphat-Puffer, 0,1 M, pH 7,3

Material:

13,801	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	primäres Natriumphosphat Monohydrat, (MW: 137,99)
17,896	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	sekundäres Natriumphosphat Dihydrat, (MW: 177,99)
ca. 2,5	l	Aqua dest.	

Durchführung:

- (1) Lösung I: primäres Natriumphosphat abwiegen und ad 1l Aqua dest. lösen.
- (2) Lösung II: sekundäres Natriumphosphat abwiegen und ad 1l Aqua dest. lösen.
- (3) Für 500 ml NaP-Puffer 116 ml Lösung I mit 384 ml Lösung II mischen.

### Protokoll 4: Natronlauge

Material:

40	g	NaOH	Natriumhydroxyd, (MW: 40,00)
ad 100	ml	Aqua dest.	

Durchführung:

- (1) 10 n (normale) Natronlauge: 40g NaOH ad 100 ml Aqua dest. Alternativ zuerst das NaOH Plätzchen abwiegen und dann im richtigen Verhältnis Aqua dest. zugeben.
- (2) 1 n (normale) Natronlauge: 1 ml 10n Natronlauge mit 9 ml Aqua dest. mischen.

**Protokoll 5: Paraformaldehyd Fixativ – 4% PFA in PBS**Material:

30	ml	10xPBS (Protokoll 1 S.XXVIII)
12	g	Paraformaldehyd
ad 300	ml	Aqua dest.

Durchführung:

- (1) Auf Grund der hohen Giftigkeit von Paraformaldehydpulver und -dämpfen alle Schritte unter dem Abzug durchführen!
- (2) 12g Paraformaldehyd in ca. 250 ml Aqua dest. abwiegen.
- (3) Für mindestens eine Stunde unter kontinuierlichem Rühren auf 60 bis 70°Celsius erwärmen und lösen bis die Lösung eine milchige Färbung annimmt.
- (4) Durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von 10 n (normaler) Natronlauge wird die Lösung unter ununterbrochenem Rühren geklärt.
- (5) 30 ml 10xPBS zugeben.
- (6) Ad 300 ml mit Aqua dest. auffüllen.
- (7) Bei 4°Celsius im Kühlschrank ca. drei Wochen haltbar.
- (8) Hinweis: Die Lösung fixiert um so besser je frischer sie ist.

**Protokoll 6: Paraformaldehyd und Glutaraldehyd Fixativ – 1% PFA, 2% GA in PBS****8%ige PFA Stocklösung**Material:

24	g	Paraformaldehyd
ad 300	ml	Aqua dest.
15	ml	Falcon-Tubes

Durchführung:

- (1) Auf Grund der hohen Giftigkeit von Paraformaldehydpulver und -dämpfen alle Schritte unter dem Abzug durchführen!
- (2) 24g Paraformaldehyd in ca. 250 ml Aqua dest. abwiegen.
- (3) Für mindestens eine Stunde unter kontinuierlichem Rühren auf 60 bis 70°Celsius erwärmen und lösen bis die Lösung eine milchige Färbung annimmt.
- (4) Durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von 10 n (normaler) Natronlauge wird die Lösung unter ununterbrochenem Rühren geklärt.
- (5) Ad 300 ml mit Aqua dest. auffüllen.
- (6) In 12,5 ml fassende Aliquotes abfüllen und im Tiefkühlschrank bei -20° Celsius aufbewahren.

## 1% PFA, 2% GA in PBS

### Material:

12,5	ml	8%ige PFA Lösung
8	ml	25%ige Glutaraldehydlösung
10	ml	10xPBS
ad 100	ml	Aqua dest.

### Durchführung:

- (1) 8%ige PFA Stocklösung aus Tiefkühlschrank im Wasserbad mindestens eine halbe Stunde auf 60 bis 70 °Celsius erwärmen, bis sie wieder klar ist.
- (2) Auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- (3) Mit 8ml Glutaraldehydlösung und 10 ml 10xPBS mischen, und auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen.
- (4) Das Fixativ ist zwei Monate im Kühlschrank haltbar.

## Protokoll 7: 1% Osmiumtetroxidlösung

### Material:

1	g	OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
ad 100	ml	Aqua dest.	

### Durchführung:

- (1) Vorsicht: Osmiumtetroxid ist hoch giftig. Stets unter dem Abzug mit entsprechender Schutzausrüstung (Kittel, Handschuhe, Schutzbrille) arbeiten.
- (2) Osmiumtetroxidampulle kurz in flüssigen Stickstoff tauchen um das kristalline Osmiumtetroxid vom Glas zu lösen
- (3) Ampulle öffnen und Inhalt in 100 ml Aqua dest. lösen

## Protokoll 8: Acetonreihe, 30%ig, 50%ig, 70%ig, 90%ig

### Material:

Aceton  
Aqua dest.

### Durchführung:

- (1) Für 30%ige Lösung: 30 ml Aceton mit 70 ml Aqua dest. mischen.
- (2) Für 50%ige Lösung: 50 ml Aceton mit 50 ml Aqua dest. mischen.
- (3) Für 70%ige Lösung: 70 ml Aceton mit 30 ml Aqua dest. mischen.
- (4) Für 90%ige Lösung: 90 ml Aceton mit 10 ml Aqua dest. mischen.

## Protokoll 9: Ethanolreihe, 30%ig, 50%ig, 75%ig, 90%ig

### Material:

Ethanol absolut, unvergällt  
Aqua dest.

### Durchführung:

- (1) Für 30%ige Lösung: 30 ml Ethanol mit 70 ml Aqua dest. mischen.

- (2) Für 50%ige Lösung: 50 ml Ethanol mit 50 ml Aqua dest. mischen.
- (3) Für 75%ige Lösung: 75 ml Ethanol mit 25 ml Aqua dest. mischen.
- (4) Für 90%ige Lösung: 90 ml Ethanol mit 10 ml Aqua dest. mischen.

## Protokoll 10: Eponansatz

### Material:

24	g	Epon 812, (MW: ca. 306)
10,35	g	2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid, DDSA (MW: 266,4)
15	g	Methylnadicanhydrid, MNA (MW: 178,2)
0,65	g	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, DMP (MW: 265,4)

### Durchführung:

- (1) 24 g Epon mit 10,35 g DDSA zehn Minuten mischen.
- (2) 15 g MNA zugeben und zehn Minuten mischen.
- (3) 0,65 g DMP zugeben und mindestens zehn Minuten mischen bis es schlierenfrei ist.
- (4) Das fertige Gemisch ist im Tiefkühlschrank bei -20° Celsius haltbar.

## Protokoll 11: Einbettung in Epon

### Material:

einzubettende Probe, maximal 2 Kubikmillimeter  
NaP-Puffer (0,1 M, pH 7,3) (Protokoll 3 S.XXVIII)  
Osmiumtetroxidösung (1 % in Aqua dest.) (Protokoll 7 S.XXX)  
Aqua dest.  
Acetonreihe (30, 50, 70, 90%) (Protokoll 8 S. XXX)  
absoluter Aceton  
Schnappdeckelgläser mit Deckel  
Einmalpipetten  
Flacheinbettformen  
Epon (Protokoll 10)

### Durchführung:

- (1) Zweimaliges kurzes Waschen der Proben in NaP-Puffer.
- (2) Immersion in Osmiumtetroxidlösung für zwei Stunden. Vorsicht: sehr giftig! Nur unter dem Abzug arbeiten.
- (3) Zweimal kurz in Aqua dest. waschen.
- (4) Dreimal fünf Minuten lang in Aqua dest. waschen.
- (5) Entwässerung über die Acetonreihe: 30% (kurz), 50% (10 min), 70%, 90%, absoluter, absoluter Aceton (jeweils 30 min). Dabei Gläschen verschließen.
- (6) Aceton/Epon eins zu eins Mischung ansetzen und bis zur Homogenität rühren.
- (7) Die Proben ausreichend gut mit Aceton/Epon Gemisch bedecken. Dabei beachten, dass der Acetonanteil verdampfen wird.
- (8) Infiltration mit Aceton/Epon Mischung über Nacht in offenen Gläschen unter dem Abzug.
- (9) Infiltration mit frischem Epon für vier Stunden.
- (10) Einbettung der Proben in Epon in Flacheinbettformen mit der Einbettnummer auf Papier.
- (11) Polymerisation für zwei Tage bei 60°Celsius.

## Protokoll 12: Einbettung in LR White

### Material:

NaP-Puffer (0,1 M, pH7,3) (Protokoll 3 S. XXVIII)  
Ethanolreihe (30, 50, 75, 90%) (Protokoll 9 S. XXX)  
absoluter Ethanol, unvergällt  
LR White Resin  
Schnappdeckelgläser mit Deckel  
Einmalpipetten  
Gelatinekapseln

### Durchführung:

- (1) Zweimaliges kurzes Waschen in NaP-Puffer.
- (2) Entwässerung über die Ethanolreihe: 30% (kurz), 50% (10 min), 75%, 90% (jeweils 30 min, dabei sanft schwenken).
- (3) Weitere drei Entwässerungsschritte über 30 Minuten mit absolutem Ethanol unter sanftem Schwenken.
- (4) Ansetzen der Ethanol LR White eins zu eins Mischung und bis zur Homogenität rühren.
- (5) Die Proben ausreichend gut mit Ethanol/LR White Gemisch bedecken. Dabei beachten, dass der Ethanolanteil verdampfen wird.
- (6) Infiltration mit Ethanol/LR-White (1:1 Mischung) über Nacht in offenen Gläschen unter dem Abzug.
- (7) Infiltration mit LR-White für eine halbe Stunde, dann wechseln und
- (8) Infiltration mit frischem LR-White für 4 h.
- (9) Überführung der Proben in Gelatine kapseln mit Einbettnummer auf Papier.
- (10) Die Kapseln bis zum Rand mit LR-White befüllen und möglichst luftdicht verschließen.
- (11) Polymerisation für zwei Tage bei 50° C.

## Protokoll 13: Richardson-Färbelösung

### Material:

0,5 g Azur II  
0,5 g Methylenblau C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>3</sub>S \* H<sub>2</sub>O, (MW: 355,89)  
0,5 g Borax (Dinatriumtetraborat-Decahydrat)  
100 ml Aqua dest.  
Filterpapier, alternativ Zentrifuge

### Durchführung:

- (1) Für Lösung A 0,5 g Azur II in 50 ml Aqua dest. lösen und eine Stunde rühren.
- (2) Für Lösung B 0,5 g Methylenblau und 0,5 g Borax in 50 ml Aqua dest. lösen und eine Stunde rühren.
- (3) Lösung A und B im Verhältnis von eins zu eins mischen.
- (4) Lösung filtrieren oder zentrifugieren mit 6000/min für zehn Minuten.
- (5) Das Filtrat beziehungsweise den Überstand bei Raumtemperatur lagern.
- (6) Für die Färbung von Ultradünnschnitten die fertige Lösung auf eins zu sieben mit Aqua dest. verdünnen und eine Minute bei 80°Celsius einwirken lassen. Anschließend die Objektträger gut mit destilliertem Wasser spülen.
- (7) Die Färbelösung kann wiederverwendet werden.

## Protokoll 14: Uranylacetat in Ethanol, ca. 7%ig, gesättigt

### Material:

3,5 g Uranylacetat  
25 ml Ethanol absolut, unvergällt  
25 ml Aqua dest.  
Zentrifugenröhrchen

### Durchführung:

- (1) Vorsicht Uranylacetat ist radioaktiv.
- (2) Uranylacetat abwiegen und in der Ethanol zu Aqua dest. eins zu eins Mischung lösen.
- (3) Ansatz über Nacht stehen lassen und am nächsten Tag unaufgeschüttelt (!) zentrifugieren (3000 U/min, 10 min).
- (4) Überstand verwenden. Bodensatz verwerfen in den radioaktiven Abfall.

## Protokoll 15: Uranylacetat für Immunolabeling

### Material:

0,7 g Uranylacetat  
10 ml Aqua dest.  
Zentrifugenröhrchen

### Durchführung:

- (1) Vorsicht Uranylacetat ist radioaktiv.
- (2) Uranylacetat abwiegen und in Aqua dest. lösen.
- (3) Ansatz über Nacht stehen lassen und am nächsten Tag unaufgeschüttelt zentrifugieren (3000 U/min, 10 min).
- (4) Überstand verwenden. Bodensatz verwerfen in den radioaktiven Abfall.

## Protokoll 16: Bleicitrat nach Reynolds

Stets abgekochtes Aqua dest. verwenden, um gelöstes Kohlendioxid zu vermeiden!

### Material:

1 n Natronlauge (Protokoll 4 S. XXVIII) frisch aus NaOH-Plätzchen ansetzen (entzieht der Atmosphäre CO<sub>2</sub>, daher sollte diese Reagenz nicht älter als 6 Monate sein)

1,33 g	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Blei(II)nitrat, (MW: 331,20)
1,76 g	Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) x 2 H <sub>2</sub> O	Natriumcitrat-2-hydrat, (MW: 294,10)

Aqua dest.  
Millex GP Filter Unit 0.22 µm  
Kunststoffspritze mit Gummidichtung  
pH-Messpapier

### Durchführung:

- (1) Ca. 100 ml destilliertes Wasser 10 min lang kochen.
- (2) Anschließend abgedeckt auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- (3) Bleinitrat und Natriumcitrat in einen 50 ml Messkolben geben und etwas abgekochtes Wasser hinzufügen.
- (4) Schütteln, um ein Verklumpen der Substanzen zu vermeiden.
- (5) Ca. 30 ml Wasser nachfüllen.

- (6) Über 30 min die Lösung gleichmäßig bewegen bzw. rühren.
- (7) Die Mischung schlägt um in einen milchigen Farbton, sobald das Bleinitrat in Bleicitrat umgewandelt ist. Der Farbumschlag ist jedoch nur ein Hinweis; die Reaktion ist erst bei sorgfältigem Schütteln/Rütteln nach einer halben Stunde abgeschlossen.
- (8) Die Lösung danach ca. eine halbe Stunde ruhig stehen lassen.
- (9) Nun zur Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipette erst mal 6 ml der 1 n NaOH-Lösung geben.
- (10) Den Kolben schütteln und weiterhin abgekochtes Wasser dazugeben bis auf 50 ml Gesamtmenge.
- (11) Nochmals gründlich schütteln und den pH-Wert messen.
- (12) Der pH-Wert der Lösung sollte zwischen 11,9 und 12,1 liegen.
- (13) Ist der pH zu niedrig: mit tropfenweise Zugabe von 1 n NaOH ausgleichen
- (14) Ist der pH zu hoch, muss die Lösung verworfen werden.
- (15) Wenn die Flüssigkeit nicht klar wird, muss der gesamte Vorgang wiederholt werden!
- (16) Die Lösung ultrafilterieren.
- (17) Die filtrierte Lösung auf eine Kunststoffspritze mit Gummidichtung ziehen, entlüften und verschließen.
- (18) Spritze mit Inhalt und Datum beschriftet im Kühlschrank aufbewahren.
- (19) Die Bleicitratlösung ist so für über 4 Wochen haltbar.

## **Protokoll 17: Kontrastieren von Epon-Ultradünnschnitten**

### Material:

- Bleizitratlösung aus Kühlschrank (Protokoll 16 S. XXXIII)
- Uranylacetatlösung (Protokoll 14 S. XXXIII)
- Gridstick
- Glaspipette mit Gummiballon
- Glaspipettenverschlüsse
- Aqua dest.
- Zellstofftücher
- „Eppis“

### Durchführung:

- (1) Bleizitrat aus Spritze mit Filter in ein Eppi füllen.
- (2) Uranylacetat in Eppi füllen.
- (3) Eppis mit Uranylacetat und Bleizitrat ca. fünf bis sieben Minuten zentrifugieren. (15.000 U/min)
- (4) Fünf Schälchen mit Aqua dest. vorbereiten.
- (5) Die Blenden auf den Gridstick kleben.
- (6) Den Gridstick in die Glaspipette mit Gummiballon legen.
- (7) Aus der ersten Schale Wasser einsaugen und 30 Sekunden die Grids befeuchten.
- (8) Das Wasser wieder rauslassen und die Pipette auf einem Tuch ausklopfen.
- (9) Das Uranylacetat aufsaugen und die Pipette mit einem Verschlusskappchen verschließen.
- (10) Vier Minuten das Uranylacetat in der Pipette wirken lassen.
- (11) Das Uranylacetat zurück ins Eppi geben. Es kann wiederverwendet werden.
- (12) Die Pipette abtupfen und zweimal mit Wasser aus der ersten Schale in Sonderabfallflasche spülen.
- (13) Die Pipette wieder abtupfen.
- (14) Mit dem Wasser aus der zweiten und dritten Schale je fünf mal waschen, Abwurf in Abfallglas, dazwischen und danach abtupfen.

- (15) Das Bleizitrat aufnehmen und die Pipette mit einem frischen Verschlusskämpchen verschließen.
- (16) Das Bleizitrat drei Minuten in der Pipette wirken lassen.
- (17) Das Bleizitrat in Sonderabfallflasche geben und zwei mal mit Wasser aus der vierten Schale spülen, ab in Abfallflasche, jeweils danach abtupfen.
- (18) Mit Wasser aus der vierten und fünften Schale je fünf mal waschen, ab in Abfallglas, dazwischen und danach abtupfen.
- (19) Den Gridstick aus der Glaspipette holen und die Grids zurück in die Schälchen räumen.
- (20) Alle genutzten Materialien gut abwaschen.

## Protokoll 18: Kontrastieren von LR White-Ultradünnschnitten

### Material:

Uranylacetat in wässriger (!) Lösung (Protokoll 15 S. XXXIII)  
Gridstick  
Glaspipette mit Gummistopfen  
Glaspipettenverschluss  
Aqua dest.  
Zellstofftücher

### Durchführung:

- (1) Eppi mit Uranylacetat ca. fünf bis sieben Minuten zentrifugieren. (15 000 U/min)
- (2) Drei Schälchen mit Aqua dest. vorbereiten.
- (3) Die Blenden auf den Gridstick kleben.
- (4) Den Gridstick in die Glaspipette mit Gummiballon legen.
- (5) Aus der ersten Schale Wasser einsaugen und 30 Sekunden die Grids befeuchten.
- (6) Das Wasser rauslassen und die Pipette auf Tuch ausklopfen
- (7) Das Uranylacetat aufsaugen und die Pipette mit einem Verschlusskämpchen verschließen.
- (8) Vier Minuten das Uranylacetat in der Pipette wirken lassen.
- (9) Das Uranylacetat zurück in Eppi geben. Es kann wiederverwendet werden.
- (10) Die Pipette abtupfen und zweimal mit Wasser aus der ersten Schale in Sonderabfallflasche spülen.
- (11) Die Pipette wieder abtupfen.
- (12) Mit dem Wasser aus der zweiten und dritten Schale je fünf mal waschen, ab in Abfallglas, dazwischen und danach abtupfen.
- (13) Den Gridstick aus der Glaspipette holen und die Grids zurück in die Schälchen räumen.
- (14) Alle genutzten Materialien gut abwaschen.

## Protokoll 19: NaP-Puffer 0,2 M, pH 7,4

### Material:

27,598 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	primäres Natriumphosphat Monohydrat, (MW: 137,99)
35,598 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	sekundäres Natriumphosphat Dihydrat, (MW: 177,99)
Aqua dest.		

Durchführung:

- (1) Primäres Natriumphosphat ad einem Liter Aqua dest. lösen ergibt Lösung I.
- (2) Sekundäres Natriumphosphat ad einem Liter Aqua dest. ergibt Lösung II.
- (3) 19,2 ml der Lösung I mit 80,8 ml der Lösung II mischen.
- (4) Bei 4° Celsius aufbewahren.

**Protokoll 20: EM-PBS**Material:

5 ml NaP-Puffer (Protokoll 3 S. XXVIII) 0,2 M pH 7,4  
0,98 g NaCl Natriumchlorid, (MW: 58,44)  
ad 100 ml Aqua dest.  
Millex GP Filter Unit 0.22 µm  
Spritze 20 ml

Durchführung:

- (1) NaP-Puffer und NaCl in Aqua dest. lösen und mit Aufziehkanüle in Spritze aufziehen.
- (2) Den Filter aufsetzen und verschlossen bei 4°Celsius im Kühlschrank lagern.
- (3) Die Lösung frisch filtriert verwenden.

**Protokoll 21: EM-Puffer****Tween 20 - 10 %ige Grundlösung**Material:

4 ml Tween 20  
ad 40 ml Aqua dest.

Durchführung:

- (1) Tween 20 mit Aqua dest. mischen. Vorsicht: Das schäumt stark.

**EM-Puffer**Material:

5 ml NaP-Puffer (Protokoll 3 S. XXVIII) 0,2 M pH 7,4  
0,98 g NaCl Natriumchlorid, (MW: 58,44)  
1000 µl Tween 20 - 10%ige Grundlösung (Protokoll 21)  
250 µl CWF-Gelatine  
1 g BSA fraction V  
ad 100 ml Aqua dest.  
Millex GP Filter Unit 0.22 µm  
Spritze 50 ml

Durchführung:

- (1) CWF-Gelatine vor Gebrauch auf ca. 40°Celsius erwärmen, damit sie pipetierbar wird und die Pipettenspitze zum Pipetieren abschneiden.
- (2) NaP-Puffer, NaCl, Tween 20, CWF-Gelatine, BSA fraction V in Aqua dest. lösen.
- (3) Die Lösung mit einer Aufziehkanüle aufziehen und danach filtrieren.
- (4) In zwei und vier Milliliter Aliquoten abfüllen und bei - 20° Celsius aufbewahren.

## Protokoll 22: Blocking-Puffer

### Material:

500 µl Normal Goat Serum  
500 mg Ovalbumin Grade V  
ad 20 ml EM-Puffer (Protokoll 21 S. XXXVI)  
Millex GP Filter Unit 0.22 µm  
Spritze 20 ml

### Durchführung:

- (1) Goat Serum und Ovalbumin in EM-Puffer lösen.
- (2) Mit Aufziehkanüle in Spritze aufziehen und anschließend filtrieren.
- (3) In ein Milliliter Aliquotes bei -20° Celsius aufbewahren.

## Protokoll 23: PBS Glycin Lösung 50 mM

### Material:

0,376 g Glycin  
ca. 20 ml EM-PBS (Protokoll 21 S. XXXVI)  
Millex GP Filter Unit 0.22 µm  
Spritze 20 ml

### Durchführung:

- (1) Für die Lösung I 0,376 g Glycin ad 10 ml EM-PBS lösen.
- (2) Für die 50mM Glycin Lösung 1 ml der Lösung I mit 9 ml EM-PBS mischen.
- (3) Fertige Lösung in Spritze aufziehen und filtrieren.
- (4) Bei 4° Celsius aufbewahren.

## Protokoll 24: Blocking-Puffer mit 1% Perfect-Block

### Perfect-Block 10%ige Grundlösung

### Material:

0,5 g Perfect-Block  
ad 5 ml Aqua dest.  
Millex GP Filter Unit 0.22 µm  
Spritze 10 ml

### Durchführung:

- (1) Perfect-Block in Aqua dest. lösen, auf Spritze aufziehen und filtrieren.
- (2) In 0,5 ml Aliquotes bei -20 °Celsius aufbewahren.

### Blocking-Puffer mit 1% Perfect-Block

### Material:

320 µl Blocking-Puffer (Protokoll 22)  
35,6 µl 10%ige Perfect-Block Grundlösung

Durchführung:

- (1) Blocking-Puffer mit Perfect-Block Grundlösung mischen.

**Protokoll 25: Immunogoldstaining Grundprotokoll****Vorbemerkung:**

- (1) Negativ Kontrolle nicht vergessen.
- (2) Sicherheitshalber jeweils zwei Grids markieren.
- (3) Tropfen von 40 µl Größe verwenden.
- (4) Die Grids mit dem Schnitt nach unten auf die Tropfen legen.
- (5) Die Grids vorsichtig mit einer antimagnetischer Pinzette von Tropfen zu Tropfen heben und dazwischen Pinzette immer wieder abtrocknen.
- (6) Die Pinzette bei einem Wechsel der Lösung oder der Konzentration mit Aqua dest. abspülen und mit Filterpapier abtrocknen.
- (7) Antikörper aus Kühlschrank anschnipsen, anzenrifugieren, in Pipette mischen und gleich wieder in Kühlschrank legen.

**1. Tag – primäre Antikörper**Material:

EM-PBS (Protokoll 20 S. XXXVI)  
 Blocking-Puffer Aliquot (Protokoll 22 S. XXVII)  
 Primärer Antikörper  
 Aqua dest.  
 Filterpapier  
 Parafilm  
 feuchte Kammer wie beispielsweise Mikrotiterplatte

Durchführung:

- (1) Parafilm (saubere Seite nach oben) in Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier (feuchte Kammer) anheften und beschriften.
- (2) Tropfen auftragen und Grids auf Tropfen übertragen.
- (3) EM-PBS 5 min
- (4) Blocking-Puffer 1 h
- (5) Primären Antikörper in Blocking-Puffer nach unten stehender Tabelle 1 verdünnen.
- (6) Primärer Antikörper in Blocking-Puffer bzw. Blocking-Puffer (Kontrolle) über Nacht bei + 4° Celsius im Kühlschrank auf Grids einwirken lassen.

Tabelle 1: Primärer Antikörper in µl verdünnen mit Blocking-Puffer µl

Verdünnung / Benötigte Tropfenzahl	1:50	1:100	1:200	1:500
2	1,6 : 80	0,8 : 80	0,4 : 80	0,16 : 80
4	3,2 : 160	1,6 : 160	0,8 : 160	0,32 : 160
6	4,8 : 240	2,4 : 240	1,2 : 240	0,48 : 240

## 2. Tag – sekundärer Gold-Antikörper

### Material:

EM-Puffer Aliquot (Protokoll 21 S. XXXVI)  
 sekundärer Gold-gekoppelter Antikörper  
 EM-PBS (Protokoll 20 S. XXXVI)  
 Aqua dest.  
 Filterpapier  
 Parafilm  
 Mikrotiterplattendeckel oder Mikrotiterplatte  
 feuchte Kammer

### Durchführung:

- (1) Die saubere Seite des Parafilms auf einem Mikrotiterplattendeckel oder die Mikrotiterplatte andrücken und in eine feuchten Kammer stellen.
- (2) Tropfen auftragen und Grids auf Tropfen übertragen.
- (3) Waschen in EM-Puffer 5 mal 10 min
- (4) Sekundären Antikörper nach unten stehender Tabelle 2 verdünnen.
- (5) Nach dem Verdünnen anschnipsen und für 10 min bei 15.000 U/min zentrifugieren.
- (6) Für die Markierung nur den Überstand verwenden und den Bodensatz verwerfen.
- (7) sekundärer Antikörper 2 h
- (8) Waschen in EM-Puffer 2 mal 10 min
- (9) Waschen in EM-PBS 3 mal 10 min
- (10) Spülen der Grids über die Pinzette (vorsichtig den Strahl nicht direkt auf das Grid richten) mit Aqua dest.
- (11) Die markierten Grids in eine Petrischale mit Parafilm zum Trocknen und aufbewahren stellen.

Tabelle 2: Sekundärer Antikörper in  $\mu\text{l}$  verdünnen mit EM-Puffer in  $\mu\text{l}$  (insgesamt ergibt es ca. 100  $\mu\text{l}$  mehr, damit der abzentrifugierte Bodensatz übrig bleiben kann)

Verdünnung/ Tropfenzahl	1:10	1:20	1:40	1:50	1:100
4	24 : 240	12 : 240	6 : 240	5 : 250	2,5 : 250
6	32 : 320	16 : 320	8 : 320	7 : 350	3,5 : 350
8	40 : 400	20 : 400	10 : 400	8 : 400	4 : 400

## Protokoll 26: Immunogoldstaining Anti-E-Cadherin

Die Immunmarkierung mit Anti-Ecad erfolgte nach dem Standardprotokoll.

### **Primärer Antikörper:**

Anti-E-Cadherin  
 Purified Mouse Monoclonal  
 Material Number: 610181  
 Lot Number: 20080  
 BD Bioscience  
 Verdünnung 1:100

**Sekundärer Antikörper:**

Goat-Anti-Mouse IgG 10 nm  
Immunogold conjugate  
Product Number: GAM 10 nm  
BBInternational solutions, USA  
Verdünnung 1:40

**Protokoll 27: Immunogoldstaining Anti-SOX2**

Die Immunmarkierung mit Anti-SOX2 erfolgte nach dem Standardprotokoll.

**Primärer Antikörper:**

Anti-SOX2  
Purified Rabbit Polyclonal  
Clone: AB5603  
Lot Number: 1956419  
EMD Millipore Corporation, Temecula California, USA  
Verdünnung 1:100

**Sekundärer Antikörper:**

Goat-Anti-Rabbit IgG 15 nm  
Immunogold conjugate  
Lot Number: GAR-00401/1  
AURION, PD Wageningen, The Netherlands  
Verdünnung 1:40

**Protokoll 28: Immunogoldstaining Anti-alpha-sma**

Die Immunmarkierung mit Anti- $\alpha$ -sma erfolgte nach dem Standardprotokoll. Anstatt des normalen Blocking-Puffer wurde der Blocking-Puffer mit 1% Perfect-Block (Protokoll 24 S. XXXVII) verwendet.

**Primärer Antikörper:**

Anti-Aktin, alpha-Smooth Muscle  
Purified Mouse Monoclonal  
Clone: 1A4  
Product Number: A5228  
Lot Number: 073M4768V  
Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim  
Verdünnung 1:1000

**Sekundärer Antikörper:**

Goat-Anti-Mouse IgG 10 nm  
Immunogold conjugate  
Product Number: GAM 10 nm  
BBInternational solutions, USA  
Verdünnung 1:40

## Protokoll 29: Immunogoldstaining Anti-Laminin

Die Immunmarkierung mit Anti-Laminin erfolgte nach dem Standardprotokoll.

### Primärer Antikörper:

Anti-Laminin

Antibody produced in rabbit, affinity isolated

Product Number: L9393

Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Verdünnung 1:20

### Sekundärer Antikörper:

Goat-Anti-Rabbit IgG 10 nm

Immunogold conjugate

Product Number: GAR 10 nm

BBInternational solutions, USA

Verdünnung 1:40

## Protokoll 30: Kritisch-Punkt-Trocknung

### Entwässerung

#### Material:

NaP-Puffer (0,1 M, pH7,3) (Protokoll 3 S. XXVIII)

Acetonreihe (30, 50, 70, 90%)

absoluter Aceton

Probenbehälter für Trocknungsanlage

#### Durchführung:

- (1) Probenbehälter in Gefäß mit NaP-Puffer stellen, Proben in die Kammern überführen und den Probenbehälter verschließen.
- (2) Entwässerung über die Acetonreihe: 30% (kurz), 50% (5 min), 70% (5 min), 90% (10 min).
- (3) Weitere drei Entwässerungsschritte über 10 Minuten mit reinem Aceton.

### Kritisch-Punkt-Trocknung

#### Material:

Probenbehälter mit Proben in absolutem Aceton

Kohlendioxid Stahlflasche mit Steigrohr

Kritisch Punkt Trockner, EMITECH K850

#### Durchführung:

- (1) Vor Beginn überprüfen, ob alle Ventile an der Trocknungsanlage und der CO<sub>2</sub>-Flasche geschlossen sind.
- (2) Netzschalter betätigen.
- (3) Die Heizung muss ausgeschaltet sein!
- (4) CO<sub>2</sub>-Flaschenventil langsam öffnen.

- (5) Ventil „COOL“ langsam öffnen und mit konstantem Gasstrom die Kammer auf +5°C herunterkühlen. Dabei den Deckel darauflegen, damit er auch abkühlt.
- (6) Sind +8° C erreicht, Ventil „COOL“ schließen. Die Kammertemperatur sinkt um 2,5° C weiter bis auf ca. +5° C.
- (7) Probenhalter in die Kammer stellen und Deckel fest verschließen. Dabei darauf achten, dass die Proben nicht austrocknen. Im Zweifel Entwässerungsmittel in Kammer vorlegen, damit die Proben nicht trocken fallen. (Eventuell nachkühlen.)
- (8) Ventil „INLET“ öffnen und Probenkammer mit flüssigem CO<sub>2</sub> füllen. Achtung: der Flüssigkeitspegel erscheint sehr schnell! Daher muss das Ventil vorsichtig geöffnet und das Sichtfenster der Kammer sofort genau beobachtet werden. Der richtige Füllstand ist erreicht, wenn der Flüssigkeitspegel im oberen Drittel des Kammer-Sichtfensters erscheint. Temperatur überprüfen und ggf. auf +5° C nachkühlen (Öffnen des Ventils „COOL“).
- (9) Nach 3 min (in dieser Zeit die Temperatur mit dem COOL- Ventil auf +5° C halten) Ventil „EXHAUST“ öffnen und CO<sub>2</sub> bis zum unteren Fensterrand ablassen.
- (10) Ventil „EXHAUST“ schließen und Punkt 8 und 9 noch 2x wiederholen.
- (11) Nach dem letzten Ablassen Geruchskontrolle am Gasauslass, ob Gas noch Spuren von Ethanol oder Aceton enthält. Falls ja, Punkt 8 und 9 nochmals wiederholen.
- (12) Die Kammer nun wieder mit CO<sub>2</sub> füllen (Ventil „INLET“) und danach Heizung an der Vorderseite des Gerätes einschalten.
- (13) CO<sub>2</sub>-Flasche schließen.
- (14) Nach kurzer Verzögerung steigt die Temperatur in der Kammer bis über den kritischen Punkt von 35°C an. Das System benötigt dafür ca. 15min. Der Flüssigkeitsspiegel sinkt während dieser Zeit langsam ab und pegelt sich etwa auf der Mitte des Sichtfensters ein. Bei einer Temperatur von 30°C und einem Kammerdruck von 1100 psi verschwindet der Meniskus (das flüssige CO<sub>2</sub> wandelt sich schlagartig in gasförmiges um = kritischer Punkt ).
- (15) Die Temperaturkontrolle schaltet jetzt die Heizung nach Bedarf aus bzw. ein und regelt die Temperatur im Bereich von +32°C bis +38°C. Der Kammerinnendruck liegt dabei im Bereich von 1200 bis 1300 psi.
- (16) Die Kammer kann nun mit Hilfe des Ventils „BLEED“ vorsichtig belüftet werden. Der Pegel der Flussanzeige sollte sich dabei zwischen 0,5 und 1 L/min bewegen.
- (17) Wenn der Kammerdruck auf 0 psi gefallen ist (Druckausgleich), werden alle anderen Ventile geöffnet sowie die Heizung ausgeschaltet. Die Probenkammer kann nun geöffnet werden.
- (18) Wird das Gerät nicht weiter benötigt, muss es über den Netzschalter auf der Rückseite ausgeschaltet werden.

## **Protokoll 31: Besputtern**

### Material:

Proben auf Probentellern befestigt mit PLANO TEMPFIX  
Stahlflasche mit Argon  
BAL-TEC SCD 004 Sputter Coater

### Durchführung:

- (1) Argon-Flasche ¼ Umdrehung öffnen.
- (2) „Gas“-Ventil vorsichtig öffnen. Der Fluss wird im Steigrohr sichtbar. Das Ventil bis auf 5 öffnen und so lassen. Der Anzeigen sinkt langsam wieder ab. (Druckausgleich)

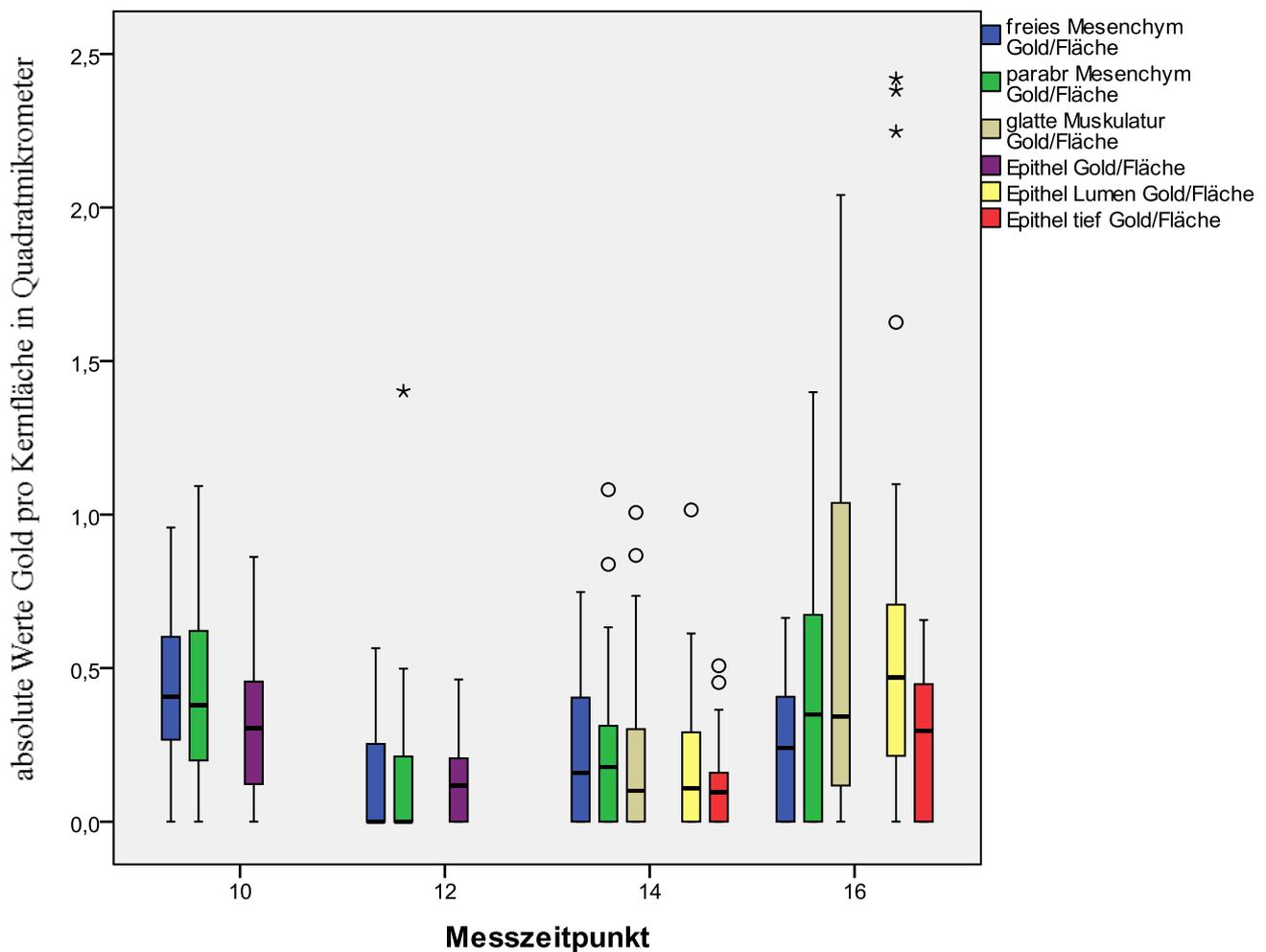
- (3) Wenn der Anzeiger nicht mehr sichtbar ist, dann kann die Klappe zur Kammer mit festem Griff geöffnet werden. Achtung: Die Klappe nach hinten oben öffnen und prüfen ob die Gasdruckfeder sie sicher vor dem Herabfallen hält.
- (4) Die Probenhalter auf die Platte stellen und dabei die Nummerierung beachten.
- (5) Die Proben sollten sich ca. auf der Höhe von 35 mm befinden.
- (6) Die Klappe mit Gefühl auf die Gummidichtung schließen.
- (7) Nun mit der linken Hand die Klappe zu drücken, mit der rechten das Ventil „Gas“ schließen und die Vakuumpumpe mit dem grünem Schalter einschalten.
- (8) Nun fällt der Druck in der Kammer, sichtbar am roten Balken von rechts nach links ( $10^{-3}$  mbar).
- (9) Jetzt den Count-down-Timer auf 70 s stellen, warten bis das Vakuum aufgebaut ist und der rote Balken ganz links bei  $10^{-3}$  mbar zu sehen ist.
- (10) Nun mit dem Gas-Ventil langsam Argon wieder einlassen bis der rote Balken zwischen den schwarzen Markierungen steht. (zwischen  $5 \times 10^{-2}$  und  $7 \times 10^{-2}$  mbar)
- (11) Den Sputter-Strom mit „Current“ auf 20 mA einstellen (ca.  $\frac{1}{2}$  Umdrehung) und schnell auf „Start“ drücken.
- (12) Jetzt läuft die Zeit rückwärts, dabei den Sputter-Strom auf 20 mA halten.
- (13) Wenn die Zeit abgelaufen ist, den Sputter-Strom wieder auf Null stellen und das Gerät mit dem grünen Schalter ausstellen.
- (14) Nun das Gas-Ventil wieder öffnen bis der Schwimmer auf 5 steht und so lassen.
- (15) Wenn der Schwimmer nicht mehr sichtbar ist, kann die Klappe vorsichtig geöffnet werden.
- (16) Nun die Proben herausnehmen und das Gas-Ventil des Sputter-Gerätes und die Argon-Flasche schließen.
- (17) Abschließend Gerätedeckel wieder verschließen, zu drücken und die Pumpe bis ein Vakuum von  $10^{-3}$  mbar wieder erreicht ist einschalten.
- (18) Gerät abschließend ausschalten.

## Statistische Ergebnisse der quantitativen Anti-SOX2- Immunogold-Untersuchung

**Tabelle: Charakterisierung der Messwerte**

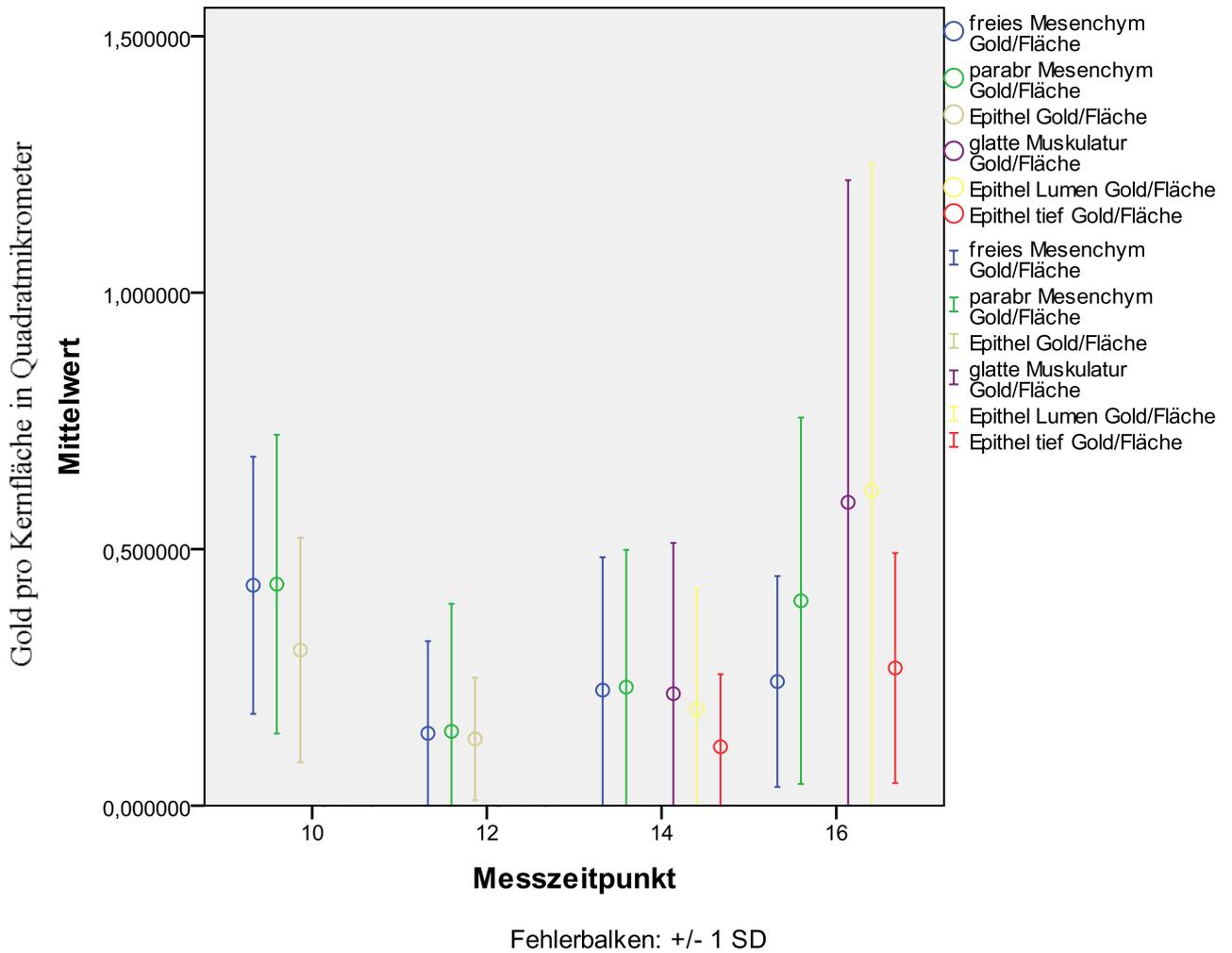
Zellarten mit den statistischen Werten (Einheit: Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometer)		Messzeitpunkt in Bruttage			
		10	12	14	16
freies Mesenchym	Mittelwert	0,429617	0,140996	0,225144	0,241958
	Standardabweichung	0,250803	0,179739	0,259214	0,205565
	Median	0,406504	0,000000	0,159114	0,240207
	Gültige N	31	38	40	40
Parabr. Mesenchym,	Mittelwert	0,431702	0,144838	0,230902	0,399380
	Standardabweichung	0,291236	0,248836	0,267758	0,357257
	Median	0,379147	0,000000	0,178094	0,349092
	Gültige N	23	41	41	42
glatte Muskulatur	Mittelwert	.	.	0,218290	0,591313
	Standardabweichung	.	.	0,293890	0,628032
	Median	.	.	0,100480	0,342466
	Gültige N	0	0	28	19
Epithel	Mittelwert	0,303306	0,129973	.	.
	Standardabweichung	0,219093	0,119441	.	.
	Median	0,304414	0,117680	.	.
	Gültige N	25	40	0	0
Epithel oben	Mittelwert	.	.	0,188010	0,613977
	Standardabweichung	.	.	0,235970	0,638423
	Median	.	.	0,108861	0,469484
	Gültige N	0	0	36	35
Epithel tief	Mittelwert	.	.	0,114662	0,268289
	Standardabweichung	.	.	0,141617	0,224396
	Median	.	.	0,095785	0,295858
	Gültige N	0	0	37	41

## Diagramm: absolute Werte Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometer als Boxplot



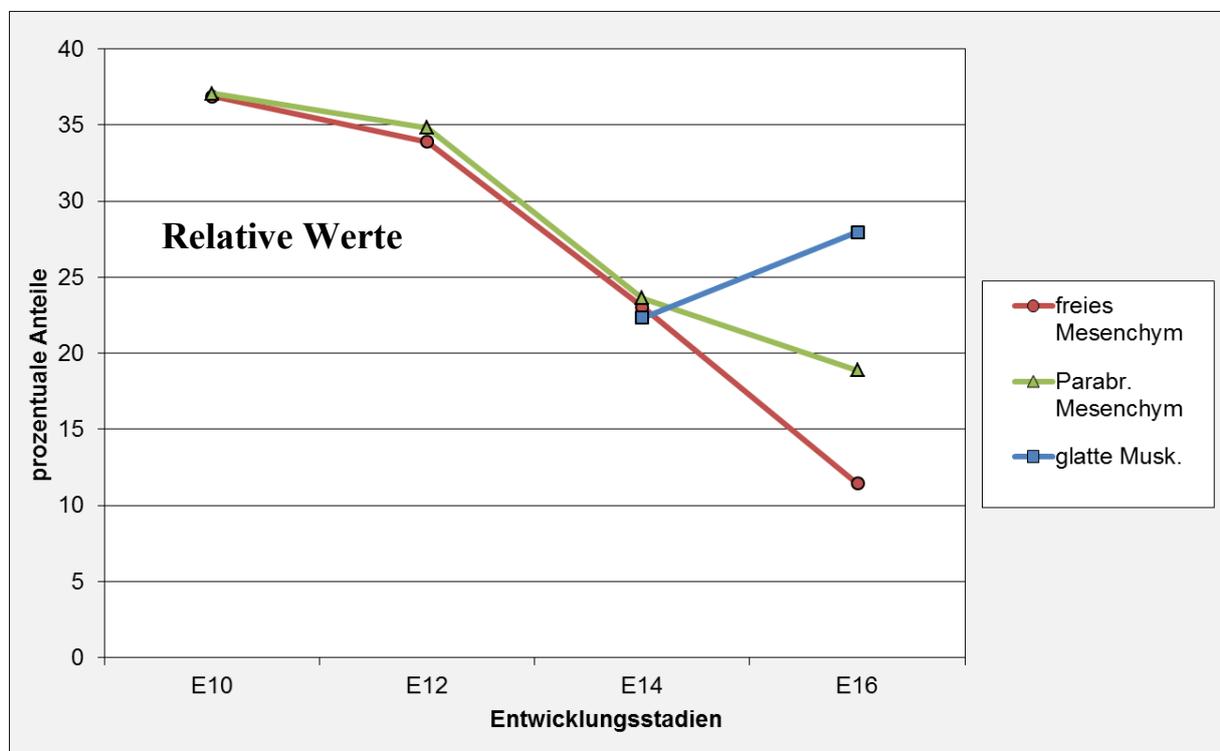
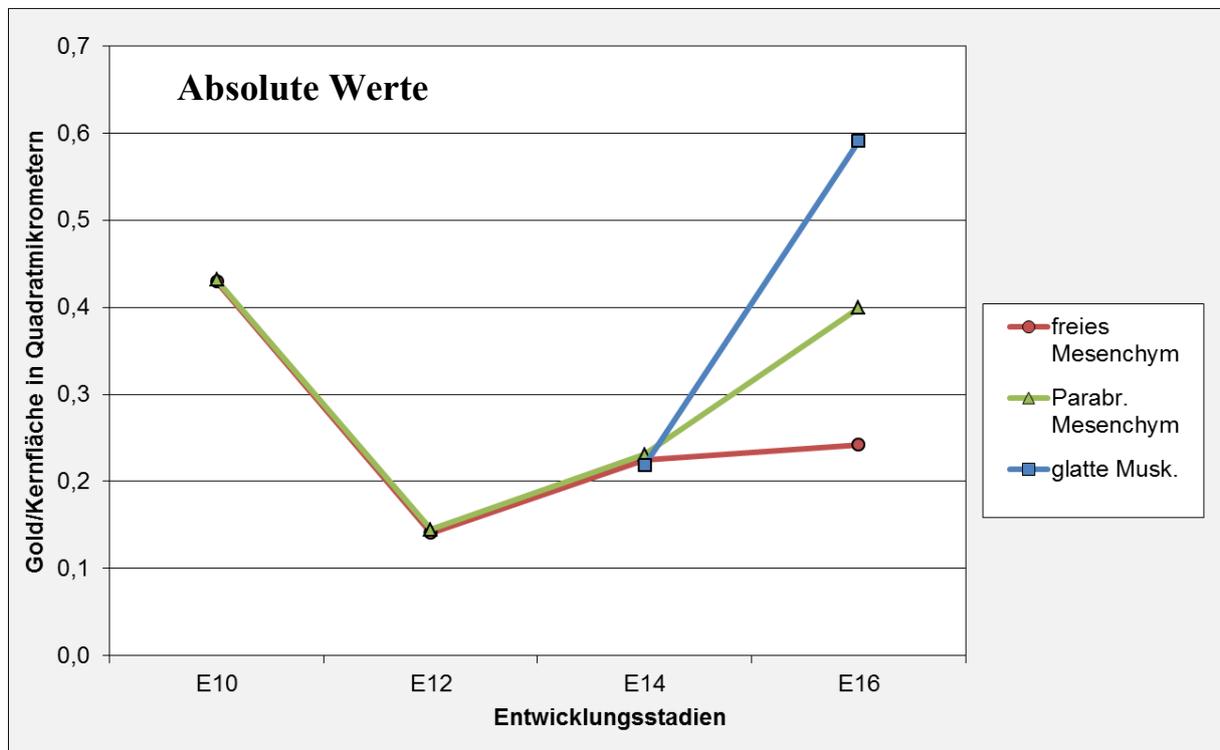
Boxplot der absoluten Werte der Gold pro Kernflächen in Quadratmikrometer der einzelnen Zellarten über die Messzeitpunkte E10, E12, E14 und E16 zur Darstellung der Rohwerte. Der Median als Mittelstrich in der Box bezeichnet, dass die Hälfte der Werte darüber bzw. darunter liegen. Die obere und die untere Begrenzung der Box bezeichnet die Quartile. Das bedeutet, dass sich jeweils 25% der Werte oberhalb der oberen Quartile, zwischen der oberen Quartile und dem Median, zwischen den Median und der unteren Quartile, sowie unterhalb der unteren Quartile befinden. Der Abstand zwischen der oberen und der unteren Quartile ist der Interquartilabstand. Dieser wird mit 1,5 multipliziert und bezeichnet so die Länge der Antennen, welche aber nur bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des 1,5fachen des Interquartilabstandes reichen. Werte darüber hinaus werden als Ausreißer bezeichnet. Milde Ausreißer (o) befinden sich innerhalb des 1,5 bis 3fachen des Interquartilabstandes, extreme Ausreißer (\*) außerhalb des dreifachen des Interquartilabstandes. Aufgrund des geringen Datensatzes werden die Ausreißer mit einberechnet. Erstellt mit SPSS Version 19.

**Diagramm: absolute Werte Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometer als Balkendiagramm mit arithmetischem Mittelwert und einmal Standardabweichung**



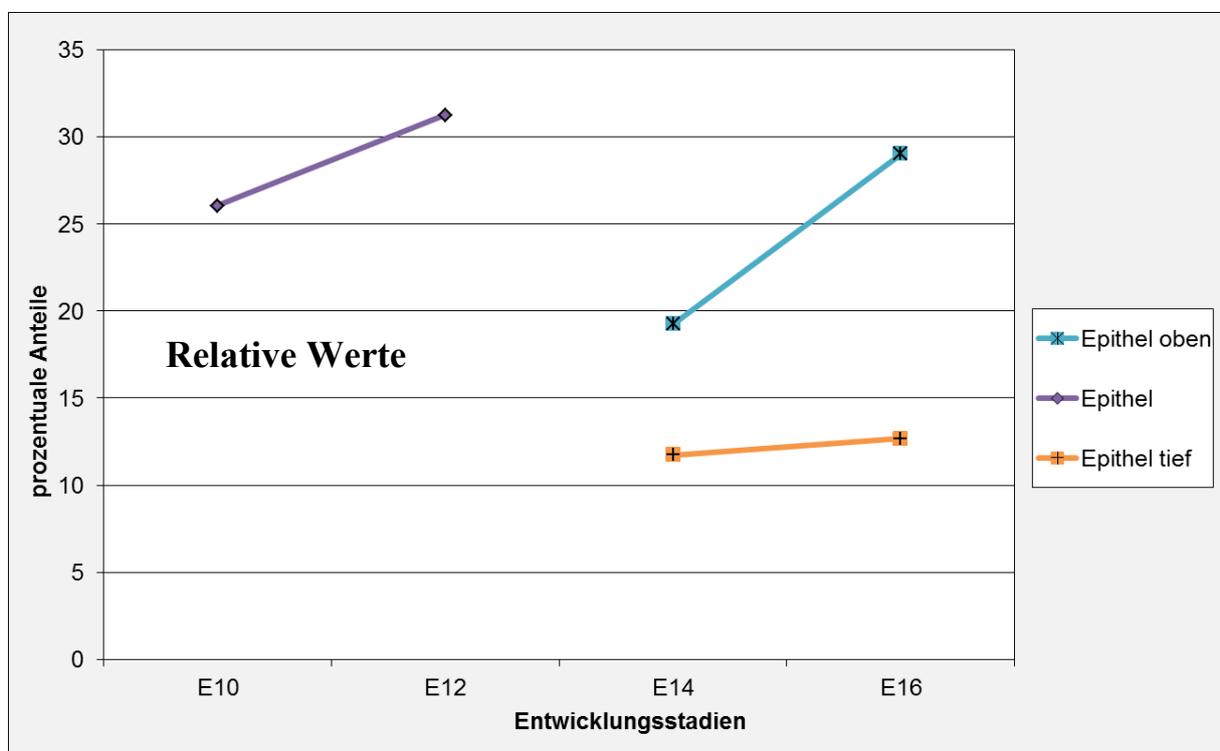
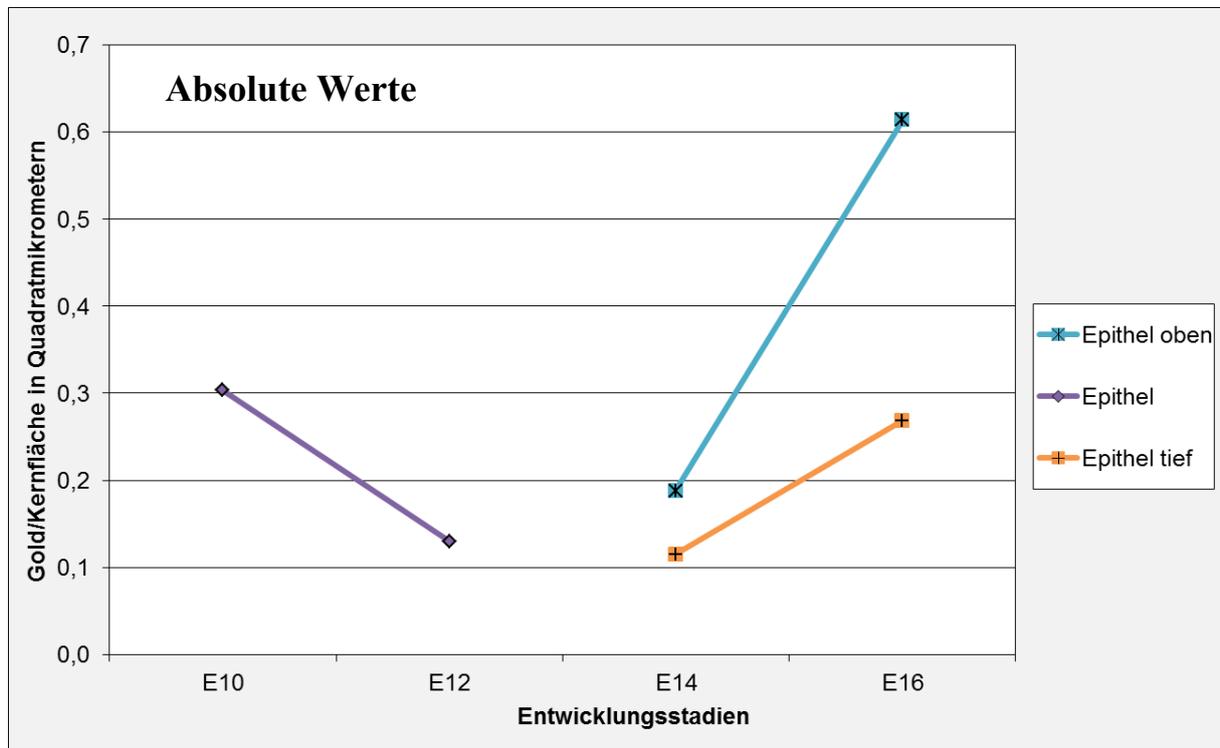
Absolute Werte Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometer der einzelnen Zellarten als Balkendiagramm mit Darstellung des arithmetischen Mittelwertes (o) und einmal Standardabweichung (SD) als Antennen. Die Messzeitpunkte bezeichnen die Entwicklungsstadien E10, E12, E14 und E16. Es wird eine sehr hohe Streubreite der Daten ersichtlich. Erstellt mit SPSS Version 19.

## Diagramm: absolute und relative arithmetische Mittelwerte Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometern der Mesenchymzellen



Zur Beschreibung siehe 5.3.2 Die Markierung mit Anti-SOX2-Antikörpern S.67 ff. Erstellt mit Microsoft Office Exel 2007.

## Diagramm: absolute und relative arithmetische Mittelwerte Gold pro Kernfläche in Quadratmikrometern der Epithelzellen



Zur Beschreibung siehe 5.3.2 Die Markierung mit Anti-SOX2-Antikörpern S.67 ff. Erstellt mit Microsoft Office Exel 2007.

## Lebenslauf

Martha Anett Greulich, geboren am 03. Januar 1984 in Gera/Thüringen

### Schulbildung

- 1994 – 2003 Besuch des mathematischen – naturwissenschaftlichen Gymnasiums „Georg Cantor“ der Stadt Halle (Saale)/Sachsen-Anhalt
- 2002 Teilnahme am Wettbewerb „Jugend forscht“ des Landes Sachsen-Anhalt mit der Arbeit „Untersuchungen zu Mykorrhiza“
- 2003 Teilnahme am Wettbewerb „Jugend forscht“ des Landes Sachsen-Anhalt mit der Arbeit „Pilze der Orchideenmykorrhiza“
- 2003 Teilnahme an der 4. Runde der 14. Internationalen Biologie-Olympiade in Kiel zur Auswahl der deutschen Mannschaft
- 2003 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am mathematisch – naturwissenschaftlichen Gymnasium „Georg Cantor“ der Stadt Halle (Saale)/Sachsen-Anhalt

### akademische Bildung

- 2003 – 2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock, Abschluss mit der Ärztlichen Prüfung
- 26.07.2012 Erteilung der Approbation
- 2012 vierwöchiges Praktikum am Institut für medizinische Genetik der Universität Rostock unter Prof. Dr. med. Peter Meyer
- 2012 – 2015 Doktorandin und Promotionsstudentin am Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock unter PD. Dr. sc. nat. M. Frank

seit Februar 2015 Assistenzärztin in der Klinik für Psychosomatik und Psychotherapeutische Medizin der Universität Rostock unter Prof. Dr. Dr. Wolfgang Schneider, Dr. Karsten Hake und Prof. Dr. Carsten Spitzer

### Publikationen

Poster: „Development of Epithelial and Mesenchymal Compartments in the Lung Air-Sac System of the Embryonic Chicken: a Light- and Electron Microscopic Study“ beim Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, 2017 in Kiel

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ich bestätige, dass diese Arbeit in keinem anderen Promotionsverfahren als an der Universität Rostock zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin vorgelegt wurde.

Rostock, den 19. Juli 2019

Anett Greulich

