

Aus dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock

Leiter: PD Dr. sc. nat. Marcus Frank

**Elektronenmikroskopische und  
Immunzytochemische Untersuchungen  
zur Ziliogenese in multiziliären Zellen der  
Trachea des embryonalen Hühnchens  
(*Gallus gallus domesticus*)**

Inauguraldissertation zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Alexander Reinke, geb. am 14.05.1996 in Parchim

Aus 19067 Leezen, Blumenstraße 12

Rostock, 26.01.2022

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00004274](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004274)

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universität Rostock

1. Gutachter: PD Dr. sc. nat. Markus Frank  
Elektronenmikroskopisches Zentrum, Rostock

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Paul Stoll  
Abteilung für Pneumologie und Interdisziplinäre Internistische  
Intensivmedizin Zentrum für Innere Medizin Universitätsklinikum  
Rostock

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Heymut Omran  
Direktor Universitätsklinikum Münster Klinik für Kinder- und  
Jugendmedizin

Datum der Einreichung: 01.03.2022

Datum der Verteidigung: 15.03.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Erkrankungen der oberen Atemwege .....	1
1.2. Huhn als Tiermodell.....	2
1.3. Klinische Diagnostik der PCD .....	4
1.4. Anatomie, Physiologie, Histologie und Embryologie der Trachea .....	5
1.5. Physiologie und Morphologie der Zilien und Mikrovilli .....	6
1.6. Ziliogenese .....	8
1.7. Untersuchungsmethoden.....	10
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	12
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1. Materialien .....	13
2.1.1. Proben und Präparation.....	13
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3. Chemikalien.....	14
2.1.4. Geräte .....	15
2.1.5. Antikörper .....	16
2.1.6. Mikroskope und Kameras .....	16
2.1.7. Software .....	17
2.2. Methoden .....	18
2.2.1. Inkubation und Präparation der Embryonen.....	18
2.2.2. Probenvorbereitung REM .....	21
2.2.3. Scan Parameter des REM .....	21
2.2.4. Kontrolluntersuchung REM .....	24
2.2.5. Probenvorbereitung TEM.....	25
2.2.6. Funktionsweise des TEM.....	26
2.2.7. Immunofluoreszenz mit dem Primärantikörper anti ac-Tub .....	26

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1. Zeitlicher Entwicklungsverlauf des respiratorischen Epithels .....	29
3.1.1. Embryonales Entwicklungsalter E 14.....	29
3.1.2. Embryonales Entwicklungsalter E 14,5.....	32
3.1.3. Embryonales Entwicklungsalter E 15.....	33
3.1.4. Embryonales Entwicklungsalter E 15,5.....	36
3.1.5. Embryonales Entwicklungsalter E 16.....	37
3.1.6. Embryonales Entwicklungsalter E 17.....	40
3.1.7. Embryonales Entwicklungsalter E 18.....	42
3.2. Besonderheiten der Verteilung von multiziliären Zellen.....	45
3.2.1. Tiefe Furchen des embryonalen respiratorischen Epithels der Trachea.....	45
3.2.2. Flache Furchen des embryonalen respiratorischen Epithels der Trachea.....	47
 <b>4. Diskussion .....</b>	 <b>48</b>
4.1. Material und Methoden.....	48
4.2. Zeitlicher Entwicklungsverlauf der Zilien .....	50
4.3. Besonderheit der Verteilung multiziliärer Zellen.....	56
4.4. Entwicklungsgradienten in der Trachea .....	57
4.5. Klinische Diagnostik und Ausblick .....	59
 <b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	 Fehler! Textmarke nicht definiert.
 <b>6. Thesen.....</b>	 <b>72</b>
 <b>7. Anhang .....</b>	 <b>73</b>
7.1. Protokolle .....	73
7.2. Besondere Bilder des respiratorischen Epithels.....	85
7.3. Veröffentlichungen.....	86
7.4. Lebenslauf.....	87
7.5. Danksagung .....	88
7.6. Eidesstattliche Versicherung.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Korrelation der embryonalen Entwicklung von Menschen und dem Huhn .....	3
Abbildung 2: Aufbau von unbeweglichen und beweglichen Zilien .....	6
Abbildung 3: Vergleich der Untersuchungsmethoden REM, TEM und IF .....	11
Abbildung 4: Übersicht der fixierten Proben.....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Trachea im Querschnitt.....	18
Abbildung 6: Detektoren des REM.....	19
Abbildung 7: REM Proben mit geringen Bildartefakten .....	20
Abbildung 8: REM Proben mit ausgeprägten Bildartefakten .....	23
Abbildung 9: Negativkontrolle REM .....	24
Abbildung 10: REM Untersuchung der Trachea E14 .....	29
Abbildung 11: TEM Untersuchung der Trachea E14.....	30
Abbildung 12: IF Untersuchung der Trachea E14 .....	31
Abbildung 13: REM Untersuchung der Trachea E14,5 .....	32
Abbildung 14: REM Untersuchung der Trachea E15 .....	33
Abbildung 15: TEM Untersuchung der Trachea E15.....	35
Abbildung 16: REM Untersuchung der Trachea E15,5 .....	36
Abbildung 17: REM Untersuchung der Trachea E16 .....	37
Abbildung 18: IF Untersuchung der Trachea E16 .....	38
Abbildung 19: TEM Untersuchung der Trachea E16.....	39
Abbildung 20: REM Untersuchung der Trachea E17 .....	40
Abbildung 21: TEM Untersuchung der Trachea E17.....	41
Abbildung 22: REM Untersuchung der Trachea E18 .....	42
Abbildung 23: TEM Untersuchung der Trachea E18.....	43
Abbildung 24: IF Untersuchung der Trachea E18 .....	44
Abbildung 25: REM Untersuchung der Trachea E17 mit tiefen Epithelfurchen .....	45
Abbildung 26: REM Untersuchung der Trachea E17 Furche .....	46
Abbildung 27: REM Untersuchung der Trachea flache Epithelfurchen E17 .....	47
Abbildung 28: REM distaler Übergang des Flimmerepithels der Trachea E 17 .....	85
Abbildung 29: REM distaler Übergang des Flimmerepithels der Trachea E 18.....	85

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bildauflösung, Scan Modus und korrelierende Scanzeit im REM .....	22
Tabelle 2: Zusammenfassung der IF Untersuchungsparameter .....	27

## Abkürzungsverzeichnis

anti ac-Tub	Monoclonal anti-acetylated Tubulin Clone 6-11B-1 der Firma Sigma
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
E	Embryonaler Entwicklungstag / Bebrütungstag
ep	mehrschichtiges Epithel der Trachea (Bildbeschriftung)
g	Gefäße (Bildbeschriftung)
IF	Immunofluoreszenz
k	Knorpelring der Trachea (Bildbeschriftung)
kV	Kilovolt
lu	Lumen der Trachea (Bildbeschriftung)
mA	Milliamper
mbar	Millibar
neu	Neuronen (Bildbeschriftung)
nm	Nanometer
m	Mikrovilli (Bildbeschriftung)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ppb	parts per billion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCD	primäre Ziliendyskinesie
psi	Pound-force per square inch
REM	Rasterelektronenmikroskop
RP	Retinitis pigmentosa
Shh	Sonic hedgehog
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
µm	Mikrometer
z	Zilium (Bildbeschriftung)

## Zusammenfassung

Die Erkrankungen der Atemwege und des respiratorischen Epithels stellen mit Millionen von betroffenen Patienten weltweit ein relevantes Problem dar (Kim et al. 2018). Jedoch existieren über die Grundlagen der embryonalen Entwicklung der mono- und multiziliären Zellen des respiratorischen Epithels der Trachea nur verhältnismäßig wenige Forschungsergebnisse. Deshalb wurde in dieser Dissertation die zeitliche Entwicklung des respiratorischen Epithels in den embryonalen Entwicklungstagen E14 bis E18, anhand des Modellorganismus des Huhns (White leghorn), mit den elektronenmikroskopischen Methoden REM und TEM, sowie mit der Immunofluoreszenz systematisch untersucht. Das Huhn ist ein guter Modellorganismus, weil anhand der Zehenlängenbestimmung und der standardisierten Bebrütungszeit eine exakte Altersbestimmung möglich ist. Die Entwicklungsstadien des Huhnes und des Menschen sind in der Arbeit von Hamburger und Hamilton zeitlich korreliert worden (Hamburger und Hamilton 1992). Während die REM Untersuchung die Oberflächenstrukturen darstellt, ermöglicht die TEM Untersuchung die Analyse der intrazellulären Prozesse während der Ziliogenese. Die IF mit dem primären Antikörper anti ac-Tub erlaubt die spezifische Darstellung der Zilienproteine. Insgesamt zeigt sich, dass die Entwicklung der Zilien an der Zelloberfläche ein schnell ablaufender Prozess ist, welcher sich in wenigen Tagen vollzieht. Am Tag E14 existieren noch keine multiziliären Zellen, sondern vorwiegend Epithelzellen mit einem Monozilium der Länge von 1 bis 2  $\mu\text{m}$ . Bereits 12 Stunden später, sind schon erste multiziliäre Zellen zu beobachten. Diese frühen multiziliären Zellen besitzen noch eine geringe Anzahl von unterschiedlich langen Zilien. In den folgenden Entwicklungstagen besteht ein beschleunigtes Wachstum der multiziliären Zellen, mit Zunahme der individuellen Anzahl und Länge der Zilien. Es zeigt sich, dass neue multiziliäre Zellen vermehrt in direkter Nachbarschaft bereits vorhandener multiziliärer Zellen entstehen. Dies führt zu einer Clusterbildung. Diese Cluster aus multiziliären Zellen sind in unregelmäßigen Abständen über das respiratorische Epithel, sowohl im kranialen als auch im kaudalen Abschnitt der Trachea verteilt. Zwischen den Clustern befinden sich vorwiegend monoziliäre Zellen. Die Entwicklung des respiratorischen Epithels ist am Tag E18 weitestgehend komplettiert. Im Zeitraum von E16 bis E18 existieren in Epithelfurchen, in Abhängigkeit von deren Tiefe, vorwiegend Epithelzellen ohne Zilien. In einer institutsinternen Arbeit wurde separat im gleichen Modellorganismus die Entwicklung des respiratorischen Epithels im Bereich der Nasenhöhle untersucht (Reinke et al. 2021). Es sind weiterführende Untersuchungen zu empfehlen, um zum Beispiel die Regenerationsprozesse des respiratorischen Epithels nach Schädigung durch toxische, virale oder bakterielle Einflüsse zu untersuchen.

# 1. Einleitung

---

## 1.1. Erkrankungen der oberen Atemwege

---

Die Luftverschmutzung ist eine globale Bedrohung für die Gesundheit und verursacht jährlich Millionen von Todesfällen (Kim et al. 2018). Die Erkrankungen der Atemwege, ausgelöst durch eine vorgeburtliche oder frühkindliche Exposition mit Luftschadstoffen, besitzen weltweit einen hohen Stellenwert in Hinblick auf die Gesundheit von vielen Menschen. Insbesondere die Entwicklungsphase der Schwangerschaft ist anfällig gegenüber negativen Einflüssen aus der Umwelt, mit dem Risiko, einen lebenslangen Effekt auf die Gesundheit der Kinder zu haben (Kim et al. 2018). So zeigt sich zum Beispiel eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der respiratorischen Erkrankungen von Kindern in Shijiazhuang (China) und der Konzentration von Stickstoffdioxid und Schwefeldioxid in der Luft (Song et al. 2018). Eine Arbeit aus Brasilien beschäftigt sich auch mit dem Thema der Luftverschmutzung und deren Folgen wie zum Beispiel den respiratorischen Erkrankungen bei Kindern (Nascimento et al. 2020). Es bestand ein erhöhtes Risiko für respiratorische Erkrankungen bei hohen Schadstoffbelastungen in der Atemluft. Nach der Geburt ist die *mukoziliäre Clearance* die primäre Verteidigung der Lunge gegen schädigende äußere Einflüsse. Sie besteht aus drei Komponenten. Dazu zählen die protektive Schleimschicht, die Feuchtigkeitsschicht auf der Oberfläche der Atemwege und das respiratorische Flimmerepithel mit den multiziliären Zellen (Bustamante-Marin und Ostrowski 2017).

Neben den durch schädigende Einflüsse erworbene Atemwegserkrankungen, existieren auch genetisch bedingte angeborene Erkrankungen. Zu den genetischen Erkrankungen zählt zum Beispiel die primäre Ziliendyskinesie (PCD). Diese ist eine genetisch heterogene rezessive Erkrankung der beweglichen Zilien. Die PCD besitzt eine geschätzte Inzidenz von circa 1 zu 15.000 Geburten (Knowles et al. 2013; Higgins et al. 2019). Sie ist das Ergebnis einer gestörten Funktion der Zilien und führt klinisch zu verschiedenen Krankheitsbildern. Dazu zählen das neonatale Atemnotsyndrom, die chronisch respiratorischen Erkrankungen mit den Bronchiektasien, den rezidivierenden Otitiden und die Infertilität. Des Weiteren nehmen Zilien eine wichtige Rolle bei der Embryogenese ein und können bei einer Schädigung zu dem *Situs inversus* führen (Horani et al. 2016; Castleman et al. 2009). Die PCD ist eine Erkrankung, welche durch Mutationen in verschiedenen Genen hervorgerufen wird. Es können Gene betroffen sein, welche für die strukturellen, funktionellen oder regulierenden Komplexe des Aufbaus und der Funktion der Zilien verantwortlich sind. Die ersten zwei PCD assoziierten Gen Mutationen betreffen das DNAI1 Gen und das DNAH5 Gen, welche für die Komponenten der äußeren Dyneinarme kodieren und circa 30 % der PCD Fälle verursachen (Horani et al. 2016).

---

Zu den Ziliopathien zählen neben der PCD, die polyzystische Nierenerkrankung, das Meckel Gruber Syndrom, das Joubert Syndrom, die Retina Degeneration inklusive Retinitis pigmentosa, die Makuladegeneration sowie die Polydaktylie (Adams et al. 2007; Wheway und Mitchison 2019; Pearson et al. 2007; Jia et al. 2019; Badano et al. 2006).

Die Differenzierung der Epithelzellen zu multiziliären Zellen wird von verschiedenen Genen gesteuert und führt bei Gendefekten zu schweren Erkrankungen. Zu diesen Genen gehören unter anderem das CCNO Gen, das Foxj1 Gen, das GEMC1 Gen und das MCIDAS Gen (Funk et al. 2015; Boon et al. 2014; Terré et al. 2016; Terré et al. 2019).

Das CCNO Gen wird im apikalen Zytoplasma der Zelle exprimiert. Störungen dieses Gens führen zu einer reduzierten Bildung von multiziliären Zellen aufgrund von Defekten in der Zentriolenvermehrung und der Migration der Zentriolen. Eine Mutation des CCNO Gens im Menschen bedingt somit eine schwere Atemwegserkrankung (Wallmeier et al. 2014; Funk et al. 2015).

Ein Defekt im GEMC1 Gen führt beim Menschen zu einem reduzierten Wachstum von multiziliären Zellen (Terré et al. 2016). Defekte im MCIDAS Gen verursachen bei Mäusen Infertilität (Terré et al. 2019). Das MCIDAS Gen kodiert für das Multicilin, welches für die Differenzierung der multiziliären Zellen notwendig ist und das Foxj1 und das CCNO Gen reguliert (Boon et al. 2014). Studien haben gezeigt, dass verschiedene Typen von neoplastischen Zellen des Pankreas und der Niere die Fähigkeit verloren haben Zilien auszubilden (Higgins et al. 2019).

## 1.2. Huhn als Tiermodell

---

Aus ethischen und rechtlichen Gründen ist die Forschung an menschlichen Embryonen in Europa nur begrenzt möglich. Die rechtliche Grundlage für die Forschung an Embryonen bildet das Embryonenschutzgesetz vom 13.12.1990, welches im Bundesgesetzblatt vom Jahrgang 1990 im Teil 1 veröffentlicht wurde. Stattdessen wird weltweit an Tiermodellen geforscht. Der Hühnerembryo, als wichtiger Modellorganismus, besitzt eine lange und namenhafte Geschichte in der Entwicklungsbiologie und Embryologie und hat viel zu den Forschungsergebnissen im Bereich der Immunologie, der Genetik, der Virologie, der Krebsforschung und der Zellbiologie beigetragen (Stern 2005). Bereits im Jahr 1951 sind die Stadien der embryonalen Entwicklung der Hühnerembryonen von Hamburger und Hamilton ausführlich beschrieben worden. Die embryonale Entwicklung wurde in insgesamt 46 Stadien unterteilt. Dies entspricht dem embryonalen Entwicklungstag 1 bis 21 (Hamburger und Hamilton 1992). Während die embryonale Entwicklung des Menschen circa 40 Wochen benötigt, beträgt die Dauer der fetalen Entwicklung im Hühnerei 21 Tage. Das erste Trimenon

---

des Menschen entspricht einer Entwicklung im Hühnerei bis zum 7. Tag der Bebrütung. Das Ende des zweiten Trimenons entspricht dem 14. Entwicklungstag im Ei (Bjørnstad et al. 2015). Diese Korrelation ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt.

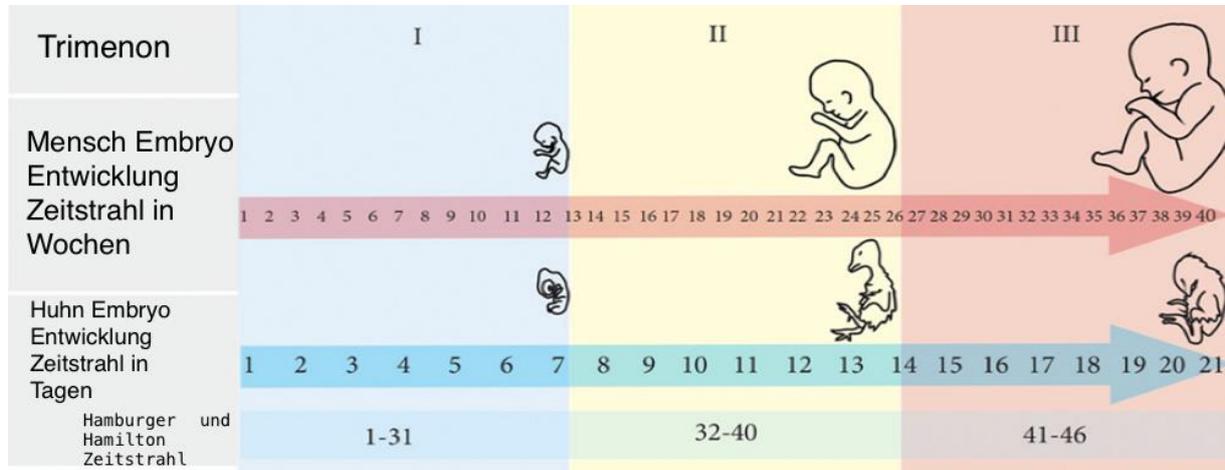


Abbildung 1: Korrelation der embryonalen Entwicklung von Menschen und dem Huhn ;  
Quelle: modifiziert nach (Bjørnstad et al. 2015)

Die Verwendung des Huhns als Modelltier besitzt folgende Vorteile. Die standardisierte Herstellung der Hühnereier ist kostengünstig, sie sind leicht verfügbar und die Inkubationszeit der Hühnereier ist gut steuerbar. Für die Erforschung des respiratorischen Epithels mit den multiziliären Zellen, anhand des Modellorganismus des Haushuhns, werden entweder die Hühnerembryonen oder die Zellkulturen untersucht. Nach der Präparation der Embryonen erfolgen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an fixierten und somit toten Zellen. Zellkulturen erlauben dagegen die Untersuchung an lebenden Zellen und damit die Erforschung des Einflusses von schädigenden Noxen auf die lebenden Zellen (Cherry und Taylor-Robinson 1970). In einer Studie aus dem Jahr 1982 wurden die Effekte einzelner Komponenten des Tabak-Rauches auf die multiziliären Zellen erforscht. Gemessen wurde der Einfluss der Komponenten auf die Aktivität der Kinozilien des respiratorischen Epithels der Trachea des Huhns (Petersson et al. 1982).

Außerdem findet das Huhn Anwendung in der Erforschung der embryonalen Expression von Genen, wie z.B. dem Sonic hedgehog Gen (Shh) und deren Einfluss auf die Neuralrohrbildung oder die Entwicklung von Extremitäten (Marigo und Tabin 1996; Zhu et al. 2020). Mit Hilfe des Tiermodells Huhn werden die Auswirkungen von Lebensmitteln oder Lebensmittelfarbstoffen auf die embryonale neurologische Entwicklung erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass Tartrazine zu Störungen im Bereich des Neuralrohres im Huhn führten. Für schwangere Frauen ist es fast unmöglich, alle Nahrungsmittelzusätze und somit mögliche toxische Auswirkungen auf den Embryo zu meiden (Ozdemir Ovalioglu et al. 2020).

So wurde zum Beispiel der Einfluss des Thyreostatikums Methimazol auf die embryonale Lungenentwicklung am Modellorganismus des Huhns erforscht (Bjørnstad et al. 2016). Diese Beispiele zeigen die besondere Bedeutung der Forschung am Tiermodell des Huhns für den Menschen.

Die Erforschung der immunologischen Prozesse in den Atemwegen, z.B. im Rahmen der Newcastle Krankheit bei Vögeln, hat gezeigt, dass das Huhn auch in der Veterinärmedizin als Modellorganismus Anwendung findet (Deist et al. 2017; Zaffuto et al. 2008). Die Ergebnisse der Forschung können dazu beitragen die Gesundheit der Nutztiere zu verbessern und den Gebrauch von Antibiotika in der Tierhaltung zu verringern. Dies hat einen direkten Einfluss auf die Gesundheit des Menschen und verringert die Resistenzbildung von Antibiotika (Hiereth 1996).

### **1.3. Klinische Diagnostik der PCD**

---

Für die klinische Diagnostik der PCD zählen, laut der europäischen Leitlinie und der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie, die klinischen Symptome, die nasale NO Konzentrationsbestimmung, die Hochgeschwindigkeitsvideo Analyse, die TEM Untersuchung, die Genom Typisierung und die Immunofluoreszenz von Proteinen der Zilien (Lucas et al. 2017; Chodhari et al. 2004; Nüßlein et al. 2013). Für die Diagnostik der PCD wird eine Kombination dieser Methoden benötigt, da es sich gezeigt hat, dass eine Methode alleine nicht geeignet ist, um alle PCD Krankheiten zu erfassen (Shapiro und Leigh 2017).

Die Messung der nasalen NO Konzentration ist für die PCD Diagnostik als ein günstiges Screening Tool beschrieben. Bei Patienten mit PCD hat sich gezeigt, dass im Vergleich zu gesunden Patienten die nasale NO Konzentration erniedrigt ist (Rademacher et al. 2017). Das standardisierte Protokoll zur Messung der nasalen NO Konzentration kann Individuen mit PCD identifizieren und ist daher ein sinnvoller Test in der klinischen Diagnostik (Leigh et al. 2013). Die PCD Diagnostik wird an einigen speziellen Zentren weltweit durchgeführt. Die medizinische Fakultät der Universität Münster zählt zu diesen Standorten. In den letzten Jahrzehnten haben genetische Untersuchungen bewiesen, dass die PCD eine sehr heterogene Erkrankung ist, welche durch viele verschiedene genetische Defekte ausgelöst werden kann (Chen et al. 2021).

Die TEM Untersuchung der respiratorischen Zilien war früher der Goldstandard zur Diagnostik der PCD, jedoch lassen sich mit der TEM Untersuchung alleine circa 30 % der PCD Fälle nicht erkennen (Omran 2020). Die Hochgeschwindigkeitsvideo Analyse erlaubt auch die Detektion von funktionellen PCD Varianten, mit einer normalen Ultrastruktur (El Zein et al. 2003; Fliegau und Omran 2006; Omran 2012; Omran et al. 2000).

In dem diagnostischen Algorithmus der PCD ist die Untersuchung mit dem REM wenig repräsentiert. Obwohl diese Untersuchung mit einer theoretischen Auflösungsgrenze von circa 1nm eine detaillierte Untersuchung des respiratorischen Flimmerepithels im Bereich der Trachea ermöglichen kann (Michler 2019).

### **1.4. Anatomie, Physiologie, Histologie und Embryologie der Trachea**

---

Die Trachea des Huhns schließt kaudal an den *Larynx cranialis* an. Sie verläuft zusammen mit dem Oesophagus ventral unter der Haut des Halses weiter nach kaudal und geht in die *Syrinx* über, welche sich spezifisch im Vogel und nicht im Menschen befindet (Miller et al. 2008). Ihr Durchmesser nimmt kaudalwärts leicht ab. Die *Cartilagine tracheales* sind geschlossene Ringe und dicht aneinandergesetzt (Kirbas Dogan und Takici 2018; Vollmerhaus 2004). Die Anzahl der Knorpelringe in der Trachea des Huhns variiert zwischen 107 bis 138. Der größte Anteil der Knorpelringe bildet einen geschlossenen Ring. Es treten auch einige inkomplette Knorpelspangen auf (Hogg 1982).

Die Trachea des Huhns ermöglicht den Gasaustausch, besitzt eine immunologische Funktion, dient der Erwärmung und Anfeuchtung der Atemluft sowie der *mukoziliären Clearance* (Bustamante-Marin und Ostrowski 2017; Vollmerhaus 2004).

Das respiratorische Epithel der oberen Atemwege besteht aus einem mehrreihigen hochprismatischen Flimmerepithel mit Becherzellen. In einem mehrreihigen Epithel sind die prismatischen Zellen unterschiedlich hoch. Die apikalen Zellen sind durch *Tight junctions* miteinander verbunden. Die Zellen, welche nicht die Oberfläche erreichen, werden Basalzellen genannt und dienen als Zellnachschieber. Die *Tunica mucosa* besteht aus der *Lamina epithelialis mucosae*, der *Lamina propria mucosae* und der *Lamina muscularis mucosae*. In der *Lamina propria* oder in den tieferen Wandschichten liegen die seromukösen Drüsen. Muzine, die das Epithel bedecken, werden aus den Becherzellen und den Drüsen sezerniert (Liebich und Budras 2010; Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Bjørnstad et al. 2015). Diese Becherzellen kleiden kryptenförmige Vertiefungen aus. Es sind endoepitheliale Drüsen. In der *Lamina propria* liegen zahlreiche seromuköse Drüsen und kleine Lymphknötchen (Vollmerhaus 2004). Das Verdauungs- und das respiratorische System der Säugetiere entwickelt sich aus einem gemeinsamen Endoderm. Es erfolgt eine Separierung der gemeinsamen Röhre in den Oesophagus und die Trachea. Störungen bei diesem Entwicklungsschritt können zu dem Auftreten einer Oesophagusatresie oder einer oesophagotrachealen Fistel führen. Der Entwicklungsverlauf des Hühnerembryos ist dem Verlauf der Maus ähnlich. Bei der Maus beginnt die Separierung am 8. embryonalen Entwicklungstag (Billmyre et al. 2015; Metzger et al. 2011).

Die Entwicklung der embryonalen Anlage des Respirationstraktes verläuft in drei Phasen. Mehrere Gene (z.B. Hox und Bmp) sind essenziell für diese Entwicklung (Sakiyama et al. 2000). Die Expression von Sonic hedgehog (Shh) wird für die Formation der Knorpelringe in den luftleitenden Atemwegen benötigt (Miller et al. 2004). Für die Bildung der Kinozilien ist die Aktivierung des Foxj1 Gens notwendig (Jain et al. 2010).

In der institutsinternen Arbeitsgruppe des elektronenmikroskopischen Zentrums der Universität Rostock sind bereits verschiedene Studien, bezüglich der embryonalen Entwicklung des respiratorischen Systems, mit dem Fokus auf die Lungenentwicklung, die Luftsäcke und genetische Marker wie z.B. Sox2 am Modellorganismus des Haushuhns, untersucht worden (Greulich 2019; Hempel 2017).

### 1.5. Physiologie und Morphologie der Zilien und Mikrovilli

---

Multiziliäre Zellen sind sowohl in einzelligen Organismen als auch in mehrzelligen Organismen vorhanden. Je nach Art des Lebewesens und der Lokalisation übernehmen diese multiziliären Zellen unterschiedliche Funktionen. Vielen einzelligen Lebewesen dienen die Zilien der Fortbewegung, der Ernährung und der Wahrnehmung von Reizen (Goetz und Anderson 2010). In mehrzelligen Organismen mit spezialisierten Geweben besitzen Zilien zusätzlich die Funktion der mukoziliären Clearance, der Bewegung von Liquor und der Entfernung von Toxinen (Brooks und Wallingford 2014). Das Axonem ist der Abschnitt des Ziliums, welcher sich membranumhüllt mit seinen Zytoskelettproteinen über die Zelloberfläche hinaus erstreckt und unterhalb der Zelloberfläche mit dem Basalkörper verankert ist. Diese beiden Bereiche sind über eine Transitionszone durch ein kontinuierliches Mikrotubuli Zytoskelett verbunden (Abbildung 2).

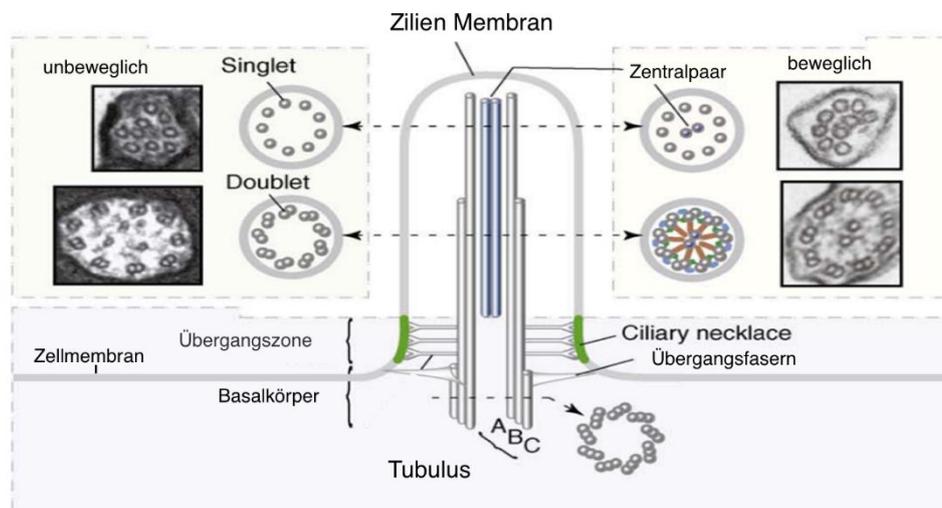


Abbildung 2: Aufbau von unbeweglichen und beweglichen Zilien  
Quelle: modifiziert nach (Silverman und Leroux 2009)

Der Basalkörper enthält eine Mikrotubuli Triplett Struktur. Das Axonem besitzt eine Mikrotubuli Doublet Struktur (Ishikawa 2017). Das Axonem von eukaryotischen Kinozilien ist ein geschlossenes System, welches, unter Verbrauch von ATP, in der Lage ist Bewegung auszuführen (Ishikawa 2017; Pearson et al. 2007).

Die Kinozilien mit der 9+2 Struktur werden aus neun Mikrotubuli Doubletten und einem zentralen Paar, aus einzelnen Mikrotubuli gebildet (Brooks und Wallingford 2014; Knowles et al. 2013; Silverman und Leroux 2009; Brody et al. 2000). Die Mikrotubuli Doubletten bestehen aus einem vollständigen A Tubulus und einem unvollständigen B Tubulus. Das Motorprotein Dynein ist am A Tubulus der Mikrotubulus Doubletten befestigt. Das Dynein wandert am B-Tubulus der benachbarten Doublette nach basal unter der Spaltung von ATP. Aufgrund der Nexin Verbindung zwischen den Doubletten wird die intern gleitende Bewegung blockiert und es findet eine Verbiegung des gesamten Ziliums statt. Dies ermöglicht, dass aus einem schnellen fördernden Schlag und aus einer langsamen Rückstellbewegung ein Bewegungszyklus entsteht. In der Trachea findet dieser Bewegungszyklus circa 15-mal pro Sekunde statt. Dynein kommt nicht nur in den Kinozilien vor, sondern ist auch ein Transportprotein für den axonalen Transport (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Brooks und Wallingford 2014; Satir und Christensen 2007).

Das eukaryotische Zilium ist von dem Zytoplasma der Zelle durch die Transitionsfasern isoliert. Im Bereich der Transitionszone befindet sich die periziliäre Membran, welche auch als ciliary necklace bezeichnet wird. Diese Membran besitzt einen hohen Anteil an Sterolen, Glykolipiden und Sphingolipiden (Fisch und Dupuis-Williams 2011; Emmer et al. 2010). Die Übergangszone des Ziliums ist der Ort an dem sich Zilienproteine für den intraflagellären Transport ansammeln (Avasthi und Marshall 2012; Kohli et al. 2017). Der intraflagelläre Transport ist für die Errichtung und Erhaltung einer Zilie verantwortlich. Makromoleküle werden von Kinesin entlang der Mikrotubuli aufwärts bis zur Spitze der Zilien transportiert. Das verbrauchte Material wird anschließend von Dynein Motoren zur Basis des Ziliums zurück befördert (Wingfield et al. 2018; Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Wachter et al. 2019). Die Dynein Motorproteine bauen sich bereits im Cytoplasma zusammen, bevor sie in das wachsende Zilium transportiert werden (Horani et al. 2018). Die Spitze des Ziliums (ciliary tip) ist der Ort, an welchem der Aufbau oder Abbau des Ziliums über den intraflagellären Transport verläuft. Das Kinozilium besitzt eine spezifische Struktur an der Spitze (ciliary crown), welche im respiratorischen Epithel von Säugetieren gefunden wird (Fisch und Dupuis-Williams 2011).

Kinozilien des respiratorischen Epithels bewegen sich nach einem speziellen Muster, bekannt als Metachronie. Es entsteht eine Welle von koordinierten Bewegungen der Zilien über die Oberfläche der Zellen. Die Zilien schlagen synchron mit ihren Nachbarn entlang der perpendicularen Achse und sind phasenverschoben entlang der metachronalen Achse (Brooks und Wallingford 2014; Liebich und Budras 2010).

Das Primärzilium ist ein nicht aktiv bewegliches Zilium und besteht aus einer 9 + 0 Tubulus - Doubletten Struktur. Die zentralen zwei Tubuli und die Dynein Arme sind nicht vorhanden. Das Primärzilium ist ein sensorisches Zilium und kann aufgrund der Rezeptoren in der Zilienmembran mechanische, osmotische und chemische Reize aus dem Extrazellularraum erfassen (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Vertii et al. 2016; Sorokin 1968; Kiprilov et al. 2008). Primäre Zilien kommen sowohl in den Nierentubuli als auch auf nicht epithelialen Zellen, wie z.B. Knorpelzellen, Fibroblasten und Nervenzellen vor (Satir und Christensen 2007).

Es existiert bisher eine bekannte Ausnahme in welcher motile Primärzilien beobachtet wurden. Die nodalen Zilien, welche sich in dem embryonalen Primitivknoten bilden, besitzen eine 9+0 Struktur und sind in der Lage eine Wirbelbewegung durchzuführen. Diese beweglichen Primärzilien werden mit der Links-Rechts-Seitendifferenzierung in der embryonalen Entwicklung in Verbindung gebracht (Nonaka et al. 1998). Defekte dieser nodalen Zilien können zum Beispiel zu einem *Situs inversus* führen (Horani et al. 2016).

Mikrovilli werden von einem axialen Bündel aus Aktin Filamenten durchzogen, die mit einer Plasmamembran verbunden sind. Das in das apikale Zytoplasma hinabreichende Aktin Bündel ist in einem Filamentnetz verankert. Das Gerüst eines Mikrovillus besteht aus circa 20 Aktin Filamenten. Die fingerförmigen Fortsätze sind je nach Zellart circa 0,1 µm dick und bis zu 2 µm lang. Das G-Aktin wird unter ATP Verbrauch zu dem helikal gewundenen F-Aktin polymerisiert. Aktinbegleitproteine sind für die Stabilität verantwortlich und können das Aktingerüst in kurzer Zeit umstrukturieren. Durch Fimbrin und Villin erfolgt die Quervernetzung der Aktinfilamente, welche das Binnengerüst von den Mikrovilli bilden. Durch das Myosin I erfolgt die Verbindung mit der Plasmamembran und durch das Spektrin und das Myosin II erfolgt die Verankerung der Mikrovilli untereinander. Die Mikrovilli tragenden Zellen kommen in verschiedenen Organsystemen, wie der Trachea oder der Dünndarmschleimhaut, des Menschen vor (Lüllmann-Rauch und Asan 2015, 2019; Liebich und Budras 2010).

### **1.6. Ziliogenese**

---

Die ultrastrukturellen Abläufe der Ziliogenese sind auf fundamentaler Ebene in verschiedenen Spezies gleich und wurden zum Beispiel in den Modellorganismen der Ratte, der Maus und dem Affen beobachtet (Kalnins et al. 1972). Die Ziliogenese verläuft in vier Phasen. Es beginnt mit der Entstehung der Zentriolen in der Nähe des Zellkerns. Nach der Duplikation der Zentriolen wandern diese in der zweiten Phase in Richtung der Zelloberfläche. In der dritten Phase bildet sich der Basalkörper aus den Zentriolen an der apikalen Zellmembran. In der vierten Phase findet das Längenwachstum der Zilien oberhalb der Zelloberfläche statt (Hagiwara et al. 2004). Die TEM Untersuchung erlaubt, aufgrund der circa 50 nm dicken

---

Schnitte, eine Untersuchung der intrazellulären Strukturen während der Ziliogenese. Schon im Jahre 1969 wurde die Bildung von Zentriolen im Bereich des respiratorischen Epithels des Huhns mit dem TEM untersucht (Kalnins und Porter 1969). In der Nähe des Zellkerns befindet sich das Zentrosom. Es ist ein circa 1  $\mu\text{m}$  großes Gebilde, bestehend aus zwei Zentriolen, welche von der perizentriolären Matrix umgeben sind. Das Zentrosom hat zwei Funktionen. Während der Zellteilung bildet es den Ursprungsort für die Ausbildung des Spindelapparates. Im Rahmen der Ziliogenese bildet es die Mutter- und Tochterzentriolen (Dawe et al. 2007). Ein Zentriol besteht aus 9 Mikrotubulus Tripletten (A, B und C Tubulus) und hat die Form eines Hohlzylinders. Dabei bilden 13 Protofilamente einen vollständigen Mikrotubulus (A Tubulus). Ein unvollständiger Mikrotubulus besteht aus 11 Protofilamenten (B und C Tubulus). Die Triplette setzt sich aus einem vollständigen und zwei unvollständigen Mikrotubuli zusammen. Das Mutterzentriol hat am distalen Ende Proteinkomplexe, die zur Verankerung der Mikrotubuli und der Befestigung des Zentriols an der Plasmamembran dienen (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Breslow und Holland 2019; Dirksen 1991; Kalnins und Porter 1969).

In spezialisierten Zellen, wie den multiziliären Zellen des Flimmerepithels im Respirationstrakt, wird eine größere Anzahl von Zentriolen gebildet. Diese wandeln sich unterhalb der Zellmembran in den Basalkörper um, woraus die beweglichen Zilien auswachsen. Um die Anzahl von Zentriolen in kurzer Zeit zu erhöhen, verwenden postmitotische Zellen Deuterosomen. Diese Deuterosomen enthalten die notwendigen Proteine, welche zur Duplikation von Zentriolen benötigt werden (Breslow und Holland 2019; Vldar et al. 2018; Avasthi und Marshall 2012; Tang 2013).

In der zweiten Phase der Ziliogenese separieren sich die Zentriolen und bewegen sich zu der apikalen Zelloberfläche. In der dritten Phase werden die Mutterzentriolen unterhalb der Zellmembran zu den Basalkörpern. Die Mutterzentriole besitzt zwei unterschiedliche Enden. Das proximale Ende enthält 9 Mikrotubuli Tripletten. Das distale Ende besteht aus 9 Mikrotubuli Doubletten. In der Mitte des Zentriols befindet sich eine Cartwheel Struktur. Der Basalkörper des Menschen enthält fünf Typen von Tubulin  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , und  $\epsilon$  (Vertii et al. 2016). Die Mikrotubuli Doubletten (A und B Tubuli) der Zilien sind die direkte Fortsetzung der Doubletten aus dem Basalkörper.

Mit dem REM lässt sich die vierte Phase der Ziliogenese anhand der Analyse der Oberflächenstruktur der Zellen untersuchen. Mit Hilfe des intraflagellären Transportes erfolgt das Längenwachstum der Zilien aus dem Basalkörper. Dieser ist verantwortlich für den Aufbau und Abbau des Ziliums und reguliert somit die finale Länge der Zilien. Mutationen in dem Spektrin Gen beeinflussen den intraflagellären Transport, unterbrechen die Bildung der Mikrotubuli im Zilium und inhibieren somit die Bildung der Zilien. Ein Gamma Tubulin Ring mit den assoziierten Proteinen ist die Grundlage für die Bildung eines neuen Mikrotubulus, der sich aus Alpha und Beta Tubulin Dimeren zusammensetzt. Der Mikrotubulus hat einen

---

Durchmesser von 25 nm (Lüllmann-Rauch und Asan 2015; Mizuno et al. 2012; Jia et al. 2019; Avasthi und Marshall 2012). Die Stabilität und Beweglichkeit von Zilien wird durch eine posttranslationale Acetylierung von Tubulin beeinflusst. Die acetylierten Mikrotubuli sind weniger anfällig für eine Depolymerisation, als die nicht acetylierten Mikrotubuli. Der Abbau von Zilien geht mit einer Deacetylierung des Tubulins und einer Methylierung von Zilien Proteinen einher (Avasthi und Marshall 2012; Sale et al. 1988). Das acetylierte Tubulin kann im Rahmen der Immunfluoreszenz spezifisch mit dem primären Antikörper anti ac-Tub gebunden und damit als Zilienmarker verwendet werden.

### 1.7. Untersuchungsmethoden

---

In dieser Dissertation werden die Zilien des respiratorischen Epithels im Bereich der Trachea am Modellorganismus des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) mit dem REM, dem TEM und der Immunfluoreszenz untersucht.

Das erste TEM wurde im Jahre 1931 mit einer maximalen Vergrößerung von 12.000x entwickelt. Im Jahre 1935 ist das erste REM mit einer geringen räumlichen Auflösung von maximal 100 µm vorgestellt worden. Das erste kommerziell verfügbare REM wurde 1965 an der Universität Cambridge benutzt. Das erste digitale REM ist 1985 der Öffentlichkeit präsentiert worden (Susan Swapp, University of Wyoming 2017).

Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit des REMs wurden viele der früheren Untersuchungen zur Ziliogenese des respiratorischen Epithels mit dem TEM durchgeführt (Sorokin 1968; Kalnins und Porter 1969; Kalnins et al. 1972; Walsh und McLelland 1978). Für die TEM Untersuchung werden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von circa 50 nm verwendet. Diese Schnitte sind dünner als der Durchmesser eines einzelnen Ziliums. Es zeigt sich, dass mit der TEM Untersuchung methodenbedingt, nicht die gesamte Zelloberfläche, bzw. der Zellverband erfasst werden kann. Die früheren Arbeiten haben den Fokus auf die intrazellulären Prozesse der Ziliogenese, insbesondere auf die Entwicklung der Zentriolen gelegt. Nebenbefundlich sind die Prozesse auf der Oberfläche mit analysiert worden (Kalnins und Porter 1969).

Mit dem heutzutage verfügbaren digitalen REM ist ein völlig neuer Ansatz zur Untersuchung der Ziliogenese möglich. Mit dem REM kann die Epitheloberfläche großflächig und gleichzeitig mit hohen Vergrößerungen analysiert werden. Somit lassen sich neue Fragestellungen wie zum Beispiel das Verteilungsmuster multiziliärer Zellen im Epithelverband, oder die Beschreibung einzelner multiziliärer Zellen in verschiedenen Entwicklungsphasen an unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen analysieren, was mit dem TEM auf diese Art nicht möglich ist. Mit der Methode der Immunfluoreszenz mit spezifischen Primärantikörpern kann die Epitheloberfläche auch auf gebogenen Strukturen gut analysiert werden.

Um die Unterschiede der genannten Untersuchungsmethoden zu verdeutlichen sind nachfolgend exemplarische Bilder des respiratorischen Epithels, welche mit den drei Untersuchungsmethoden analysiert wurden, nebeneinandergestellt (Abbildung 3). Zur besseren Veranschaulichung sind die Bilder individuell skaliert worden.

Die Vergrößerung in den Bildern A und B beträgt circa 4000x. Die Vergrößerung des Bildes C ist circa 400x. In dem Bild A der Abbildung 3 ist eine multiziliäre Zelle seitlich mit dem REM dargestellt. Die oberflächlichen Strukturen sind eindeutig zu identifizieren, die intrazellulären Strukturen sind methodenbedingt nicht erfasst.

In dem Bild B der Abbildung 3 ist ein Ultradünnschnitt einer multiziliären Zelle mit dem TEM abgebildet. Es zeigen sich die intrazellulären Bestandteile und die unterhalb des Epithels befindlichen Basalkörper. Die Oberflächenstrukturen mit den gebogenen Zilien sind methodenbedingt nur partiell dargestellt. Die Anschnitte der Zilien, zeigen im Gegensatz zur REM Untersuchung, die Ultrastruktur innerhalb der Zilien.

In dem Bild C der Abbildung 3 ist ein circa 10x größerer Ausschnitt des respiratorischen Epithels der Trachea, mit Hilfe der Immunofluoreszenz, zu sehen. Es zeigt sich der Besatz aus multiziliären Zellen an der Oberfläche des respiratorischen Epithels anhand der rot fluoreszierenden Streifen. Die Auflösungsgrenze dieser Methode erlaubt dabei jedoch keine detaillierte Darstellung einzelner mono- oder multiziliärer Zellen. Gut sichtbar ist der dichte Besatz mit multiziliären Zellen an der Zelloberfläche.

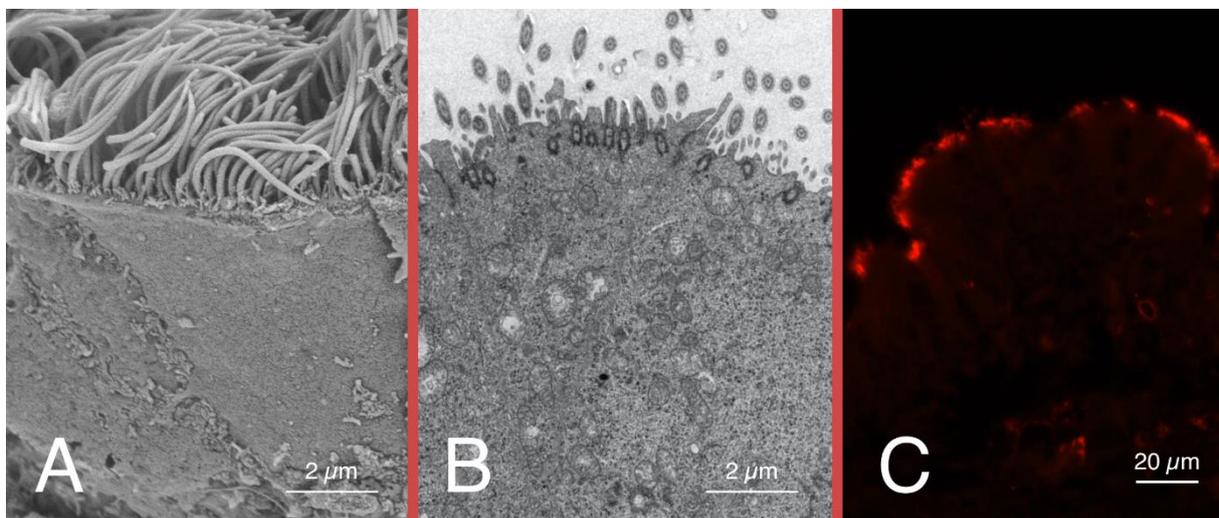


Abbildung 3: Vergleich der Untersuchungsmethoden REM, TEM und IF ; Bild A: REM Darstellung multiziliäre Zelle, seitliche Aufnahme, Bild B: TEM multiziliäre Zelle mit intrazellulärer Darstellung, Bild C: IF, multiziliäre Zellen anti ac-Tub AK, Bild A, B und C sind zum besseren Vergleich skaliert worden, Quelle: eigene Bilder

## 1.8. Zielsetzung der Arbeit

---

Es existieren nur wenige Arbeiten zur embryonalen Entwicklung des respiratorischen Epithels. Als Modellorganismen wurden unter anderem verschiedene Hühnerarten, wie das White Leghorn (Kalnins und Porter 1969) sowie das Rhode Island Red (Walsh und McLelland 1978), unterschiedliche Säugetiere, wie die Ratte (Jain et al. 2010) und das Kaninchen (Loots und Nel 1989), sowie Zellkulturen (Jain et al. 2010) aus der trachealen und der nasalen respiratorischen Schleimhaut des Menschen untersucht. Der Vorteil des Modellorganismus des Huhns gegenüber den Säugetieren ist, dass die embryonale Entwicklung im Hühnerei erfolgt und mit dem Inkubator die Rahmenbedingungen standardisiert angewandt werden. Darüber hinaus ist eine geplante Entnahme der Hühnereier aus dem Inkubator zu definierten Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung problemlos möglich. Als zusätzliche Methode zur Altersbestimmung stehen die Forschungsergebnisse von Hamburger und Hamilton (Hamburger und Hamilton 1992) seit Jahrzehnten zur Verfügung. In einer anderen Arbeit ist das embryonale Entwicklungsalter des Huhns mit dem des Menschen korreliert worden (Bjørnstad et al. 2015). Es existieren nur wenige Forschungsarbeiten, welche die elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden REM und TEM mit der Immunofluoreszenz zur Untersuchung des respiratorischen Epithels kombinieren. Institutsintern wurden parallel zwei Abschnitte des Respirationstraktes anhand des gleichen Organismus (Haushuhn) untersucht. In dieser Dissertation liegt der Fokus auf der embryonalen Entwicklung des respiratorischen Epithels im Bereich der Trachea in dem Untersuchungszeitraum von E 14 bis E 18. In einer separaten Dissertation wird der obere Teil des Respirationstraktes, mit Fokus auf der Concha nasalis media sowie dem Nasenseptum mit dem angrenzenden Nasenhöhlendach, systematisch analysiert (Reinke et al. 2021).

Der Fokus in dieser Dissertation liegt auf folgenden Fragestellungen.

1. Wie ist der zeitliche Entwicklungsverlauf des respiratorischen Epithels in den embryonalen Stadien E14 bis E18 in Hinblick auf die Ausprägung von ziliären Epithelzellen?
2. Differiert die zeitliche Entwicklung des respiratorischen Epithels zwischen den kranialen und kaudalen Abschnitten der Trachea?
3. Gibt es eine Clusterbildung von multiziliären Zellen im Rahmen der zeitlichen Entwicklung des embryonalen respiratorischen Epithels?
4. Existieren Besonderheiten in der Verteilung von multiziliären Zellen in den Epithelfurchen des respiratorischen Epithels?

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1. Materialien

---

Wir verwendeten standardisierte und auf Krankheiten geprüfte Hühnereier (SPF-Eier „White leghorn“) von der Firma VALO BioMedia GmbH, Osterholz-Scharmbeck. Jede Serie bestand aus 40 Eiern. Es besteht eine Korrelation zwischen der Raumtemperatur, der Eiinnentemperatur und der Herzfrequenz von Hühnerembryonen (Kalweit 1998). Die Hühnereier wurden gekühlt transportiert und bei 5 bis 8 Grad zwischengelagert. Vor der Einlage in den Inkubator wurden die Hühnereier für 24 Stunden bei Raumtemperatur (20 Grad Celsius) ruhen gelassen.

#### 2.1.1. Proben und Präparation

---

Zur Präparation der Hühnerembryonen ist ein normales Set, bestehend aus einem Skalpell, aus Rasierklingen, aus verschiedenen Scheren und Pinzetten, sowie einem kleinen und einem großen Probenlöffel benutzt worden. Am Ende der Präparation wurden die Proben fixiert. In der Abbildung 4 sind im Bild A die in Epon Harz eingebetteten Proben für die TEM Untersuchung dargestellt. Diese Blöcke werden in den weiteren Schnitten getrimmt und aus den Proben die Ultradünnschnitte hergestellt. In dem Bild B sind Ultradünnschnitte, welche circa 50 nm dick sind, auf einem Kupfergrid abgebildet. Das Kupfergrid wird in das TEM gelegt, um die Bilder zu erstellen. In dem Bild C sind mit Gold überzogene REM Proben auf den Probenstellern dargestellt, welche auf dem Probenstisch montiert sind. Der Probenstisch kann rotiert und gekippt werden, um die Proben aus mehreren Winkeln zu untersuchen.

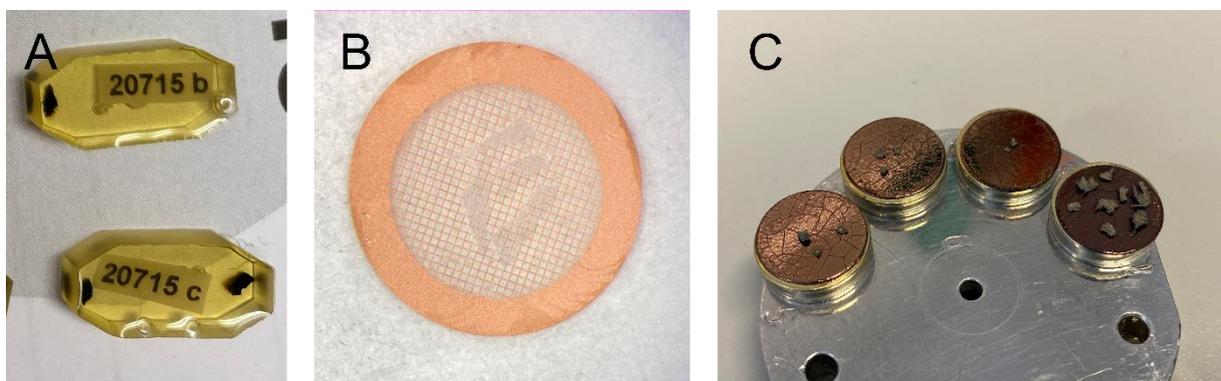


Abbildung 4: Übersicht der fixierten Proben , Bild A: TEM Proben in Epon Harz, Bild B: Kupfergrid mit Ultradünnschnitten einer TEM Probe, Bild C: REM Probensteller mit Gold überzogenen Proben, Quelle: eigene Bilder

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

---

Deckgläser 24x60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmal-Pasteurpipetten	Brand® GmbH + Co. KG, Wertheim
Eppendorf Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH
Falcon-Tubes	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Filterpapier	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gewindeflaschen	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Handschuhe	AMPri GmbH, Stelle
Multi®-Safe Seal® Tubes	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Paraffin (Paraplast Plus)	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Paraffinförmchen	Leika®
Parafilm	Bemis®, USA
Pipettenspitzen	Ratiolab® GmbH, Dreieich

### 2.1.3. Chemikalien

---

Aceton 40 bis 100 %	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Blockpuffer	5% NGS (Gibco) in 1x PBS mit 0,1% Tween 20 (aus 10% Stock 1:100)
Tween 20	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eosin G 0.5%	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Epon Harz	Serva
Ethanol vergällt	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol unvergällt 40 bis 100 %	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glutardialdehydlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Goat-Serum	PAA Laboratories GmbH, Austria
Hämatoxylin	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
LR White	Plano GmbH Elektronenmikroskopie
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumphosphat Puffer	Protokoll 10 im Anhang
Paraformaldehyd	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe

---

Paraffin	Plano GmbH Elektronenmikroskopie
PBS	Protokoll 9 im Anhang
Reinstwasser / Aqua dest.	Reinstwasseranlage / Apotheke
Roti-Histol	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylol	Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe

### 2.1.4. Geräte

---

Abzug stationär	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Inkubator für die Hühnereier	Heka Turbo
Heizofen	HEKA
Rührtische	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Zentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortexer Unimag ZX3	UniEquip Laborgerätebau GmbH
Heizplatten 35 - 80 Grad Celsius	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Ultramikrotom	Ultramikrotom Leica UMC7R
Trimmfräse	Leica Mikrosysteme GmbH,
Kritische Punkt Trocknung	Röntgenanalytik Messtechnik GmbH
Gold Sputter	BALZERS UNION Limited Balzers
Pipetten mechanisch	Wesseling Berzdorf, Deutschland
2x Kühlschränk 8 Grad	Liebherr
2x Gefrierfach - 20 Grad	Liebherr

### 2.1.5. Antikörper

---

Als Primärantikörper wird das anti ac-Tub (*Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin Clone 6-11B-1 der Firma Sigma*) verwendet. Das anti ac-Tub bindet an ein Epitop der alpha3 Isoform des Chlamydomonas axonemalen alpha Tubulins, insofern dieses acetyliert ist. Tubulin ist ein wichtiger Bestandteil der Mikrotubuli.

Als Sekundärantikörper wird der affinitätsgereinigte Alexa Fluor 594-konjugierte *Donkey Anti-Mouse IgG* Antikörper der Firma Jackson Immuno Research benutzt. Als fluoreszierende Substanz wird das Alexa Fluor 594 *carboxylic acid* eingesetzt.

### 2.1.6. Mikroskope und Kameras

---

Für die Untersuchung der aufgearbeiteten Proben der embryonalen Trachea in den verschiedenen Entwicklungsstadien wurden folgende Geräte verwendet.

REM - Feldemissionsrasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss Merlin VP compact

Auflösung: bis zu 1 nm

Beschleunigungsspannung: 6 kV

Probenteller: 9

Detektoren: HE-SE2, BSE, In-lensDuo SE/BSE

TEM - Transmissionselektronenmikroskop der Firma Zeiss EM 902

Auflösung: bis zu 0,3 nm

Beschleunigungsspannung: 80 kV

Ausstattung: 1x 2k FT-CCD Kamera (Proscan), Energiefilter (Spiegelprisma)

1x Fluoreszenz Mikroskop

Zeiss

Vergrößerung: bis 400 x

1x Kamera AxioCam

ERC5S Zeiss GmbH Göttingen

Auflösung: 1080p

4x Lichtmikroskope

Zeiss

Vergrößerung: bis 400 x

## **2.1.7. Software**

---

### **Betriebssysteme**

- Windows 7
- Windows 10
- Mac OS Big Sur

### **Geräte spezifische Software**

- REM - Zeiss Betriebssoftware
- TEM - iTEM Bildaufnahmesoftware von Olympus soft imaging solutions für die Proscan-Kamera
- AxioCam - Zen2 blue edition Carl Zeiss Microscopy GmbH für Kamera ERC5S

### **Datenverarbeitung**

- Microsoft Word 2020
- Citavi 6 von Swiss Academic Software
- Sketch Version 69.2

## 2.2. Methoden

---

### 2.2.1. Inkubation und Präparation der Embryonen

---

Die Eier wurden zeitgleich in einen Inkubator gelegt. Im Inkubator besteht eine konstante Temperatur von 37,8 Grad Celsius und eine Luftfeuchtigkeit von circa 60 Prozent. Die integrierte Wendeautomatik dreht die Hühnereier entlang der Längsachse in einem festgelegten Intervall (circa 1x pro Stunde) eigenständig. Nach einer initialen Aufwärmphase, der Inkubator ist bereits vorgewärmt, beginnt die Entwicklung der Embryonen. Diese Bebrütungsparameter entsprechen dem gängigen Verfahren (Hamburger und Hamilton 1992). Die Eier sind zwischen dem 14. und dem 18. embryonalen Entwicklungstag aus dem Inkubator entnommen worden. Anschließend wurden die Eier 45 Minuten mit Eis gekühlt, mit dem Ziel die weitere Entwicklung der Embryonen zu stoppen. Im Protokoll 1 sind die Schritte der Präparation dokumentiert. Zur Kontrolle des Alters der bebrüteten Embryonen, welche zu definierten Zeitpunkten aus dem Inkubator entnommen worden sind, wurde die mittlere Zehe des linken Fußes abgetrennt und nach der Methode von Hamburger und Hamilton vermessen (Hamburger und Hamilton 1992).

Für die Untersuchungen mit dem REM, dem TEM und der IF sind unterschiedliche Probenvorbereitungen notwendig. Eine ideale REM Probe besitzt eine annähernd flache Oberfläche und ist nicht verunreinigt. Um die innere Oberfläche der Trachea im REM untersuchen zu können, ist es notwendig die Ringe der Trachea in circa drei gleich große Stücke zu zerteilen (Abbildung 5).

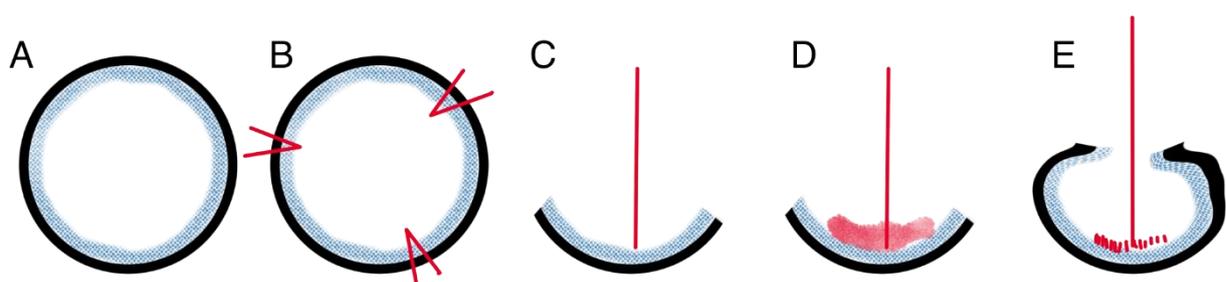


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Trachea im Querschnitt ; A: gesamte Trachea, B: Trachea wird mit drei Schnitten unterteilt, C: Der Elektronenstrahl (rot) trifft auf das Flimmerepithel, D: Der Elektronenstrahl trifft auf eine Verschmutzung, E: Die Probe ist strukturell verändert, sodass der Elektronenstrahl nur einen kleinen Teil erreichen kann; Quelle: eigene Grafik

Verschmutzungen der Zielstruktur werden vermieden, indem noch während der Präparation die Trachea mit PBS Puffer gespült und grobe sichtbare Verunreinigungen (z.B. Blutkoagel, Fibrin, Federn, Muskelgewebe, Knorpelstücke) mit einer Pinzette vorsichtig unter dem Mikroskop entfernt werden. Im Rahmen der Vorbereitung der organischen Proben für die

Untersuchung im REM, tritt bei der Kritischen Punkt Trocknung eine Verstärkung der vorhandenen Krümmung auf. Dies hat zur Folge, dass der Elektronenstrahl des REM nicht mehr die gesamte innere Oberfläche abtasten kann, wie es in dem Bild E der Abbildung 5 schematisch veranschaulicht ist.

Die unterschiedliche Position der Detektoren in Relation zu der Probe beeinflusst die Bildqualität unabhängig von der Präparation und Vorbereitung der Proben (Abbildung 6).

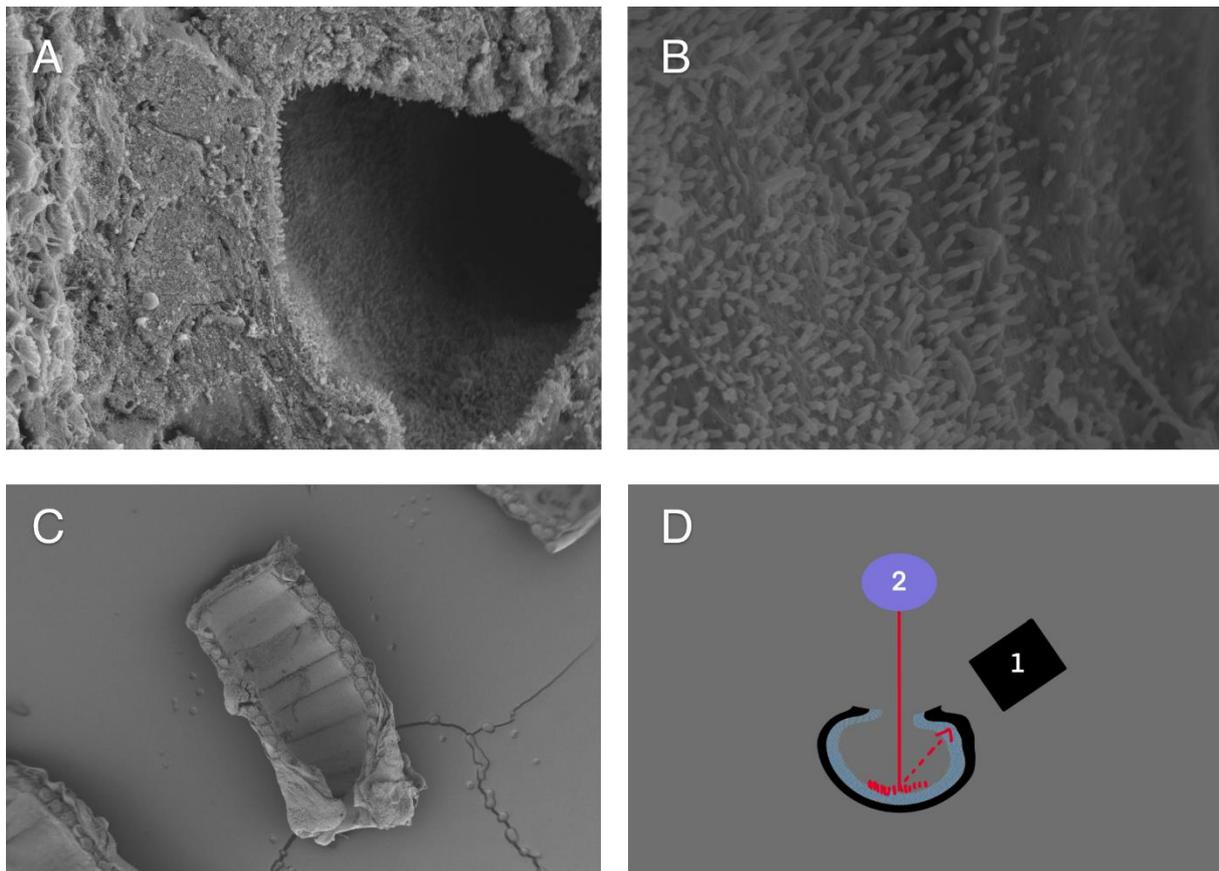


Abbildung 6: Detektoren des REM ; Bild A: Detektor HE-SE2 mit 6000 x Vergrößerung Modus 4, Bild B: InlensDuo Detektor mit Blick in die Vertiefung, bei 20.000 x Vergrößerung Modus 4; Bild C: gekrümmte Probe, 24 x Vergrößerung Detektor HE-SE2 Modus 4; Bild D: Schematische Darstellung der Wege des Elektronenstrahls zum HE-SE2 (Detektor 1) und InlensDuo (Detektor 2); Quelle: eigene Bilder

Im Bild A der Abbildung 6 ist eine Aufnahme mit dem seitlichen Detektor (HE-SE2) dargestellt. Die oberflächlichen Strukturen der Probe sind sehr detailliert erfasst, es sind jedoch kaum Informationen über die tieferen Probenanteile verfügbar. Das Bild B ist mit dem InlensDuo Detektor aufgenommen, welcher sich parallel zum Elektronenstrahl befindet. Dieser ist besser geeignet, um tiefere Strukturen zu detektieren. Während der seitliche Detektor in der Tiefe kein Signal mehr empfängt, kann der InlensDuo das Epithel mit 20.000 x Vergrößerung darstellen. Im Bild C ist eine gekrümmte Probe nach Kritischer Punkt Trocknung dargestellt. Das Bild D veranschaulicht den Strahlengang bei gekrümmten Proben. Durch die Krümmung der Probe ist der seitlich angebrachte HE-SE2 Detektor nicht mehr in der Lage alle Primär – und

Sekundärelektronen aufzufangen. Der InlensDuo Detektor kann aufgrund seiner anderen Position mehr Elektronen auffangen und erzeugt die besseren Bilder.

Durch das Auftreten von Verschmutzungen auf der inneren Oberfläche der Trachea ist eine Beurteilung des darunter liegenden respiratorischen Epithels erschwert. In der Abbildung 7 im Bild A und Bild B sind eine ideale Probe und eine verschmutzte Probe gegenübergestellt. Im Bild B zeigt sich ein dichter Belag, welcher den größten Teil der Oberfläche des respiratorischen Epithels verdeckt. Das REM ist bei derartigen Belägen nicht in der Lage die darunter liegenden Schichten des Epithels darzustellen. Bei einer gekrümmten Probe treten häufig Artefakte in Form von streifigen Linien oder dunklen Abschnitten auf (weißer Pfeil Bild C, vergrößert Bild D).

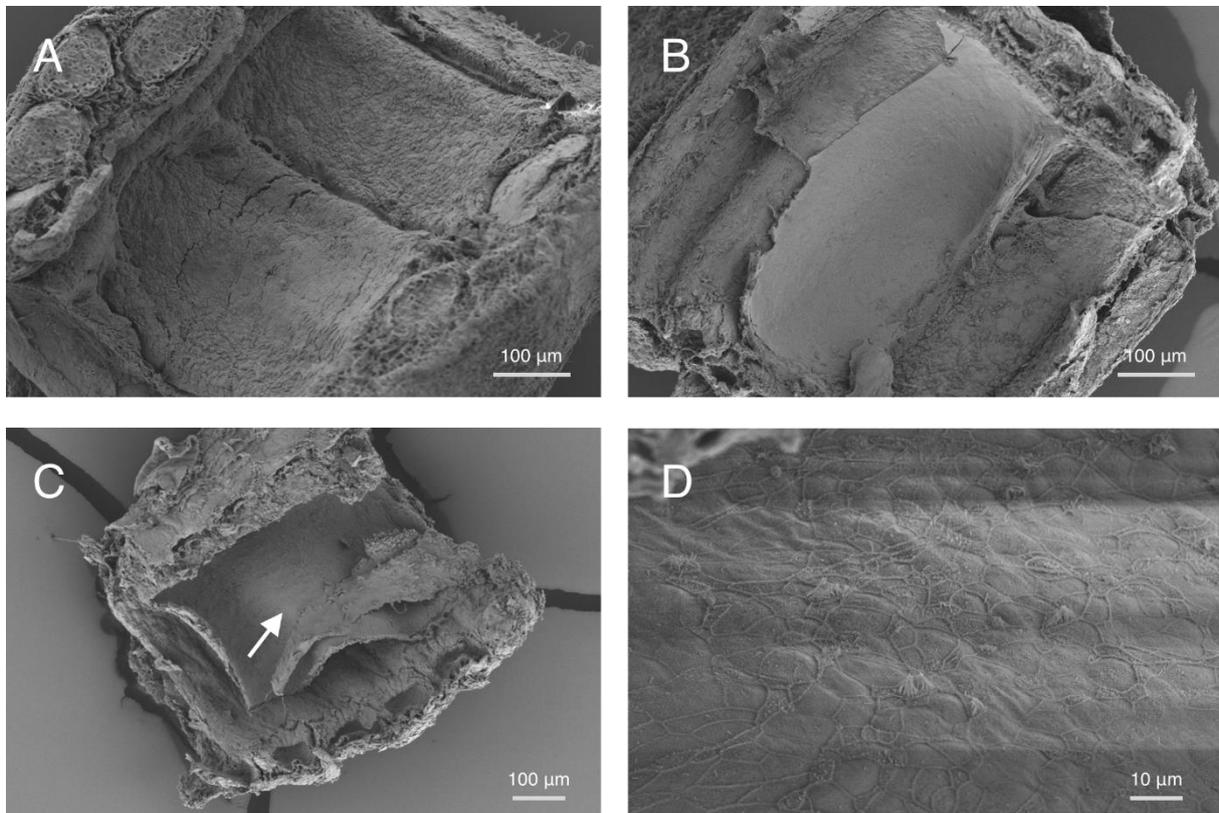


Abbildung 7: REM Proben mit geringen Bildartefakten; Bild A: saubere Probe 150 x; Bild B: verunreinigte Probe 150x; Bild C: Probe, bei der sich die einzelnen Schichten durch die Trocknung separieren und krümmen; Bild D: horizontale Bildartefakte bedingt durch die in Bild C dargestellte Topographie der Probe bei 1000 X Vergrößerung; Quelle: eigene Bilder

Für die Untersuchung im TEM wird ein kleiner Teil der Probe benötigt. Daher wurde die Probe in 4 bis 5 circa gleich große Teile zerschnitten. Für die IF wurde der Thorax zusammen mit dem Hals der Embryonen in Paraffin eingebettet und anschließend in 10 µm dicke Schnitte verarbeitet.

### **2.2.2. Probenvorbereitung REM**

---

Im ersten Arbeitsschritt wird die organische Probe in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert. Der nachfolgende Prozess der Kritischen Punkt Trocknung ersetzt das Aceton in der Probe durch flüssiges Kohlenstoffdioxid (Protokoll 2). Anschließend wird die Probe durch ein beidseitig klebendes Kohlepad auf dem Probenhalter fixiert und besputtert. Das Ziel des Besputterns ist es, die elektrische Leitfähigkeit der Probe zu vergrößern, die Signalausbeute im REM zu erhöhen, sowie die Oberfläche der Probe vor Umwelteinflüssen, zu schützen. Zu diesem Zweck wird die Probe mit einer dünnen Schicht aus Gold überzogen (Protokoll 8).

### **2.2.3. Scan Parameter des REM**

---

Das REM verwendet in einem Hochvakuum einen hochenergetischen Elektronenstrahl mit 6kV Beschleunigungsspannung, welcher auf die Probe gerichtet wird und deren Oberfläche abtastet. Dieser Elektronenstrahl tritt in die Probenoberfläche ein, woraufhin aus der Probenoberfläche Primär- und Sekundärelektronen austreten. Diese werden von den in der REM Kammer befindlichen Detektoren aufgenommen und quantitativ erfasst (Michler 2019). Das verwendete REM besitzt zwei Detektoren. Der InlensDuo Detektor befindet sich parallel zum Elektronenstrahl und somit senkrecht zur Probenoberfläche. Der HE-SE2 Detektor ist seitlich der Probe lokalisiert und wurde für die meisten Bilder verwendet.

Folgende Parameter beeinflussen die Qualität der Bilderzeugung im REM:

- die Beschleunigungsspannung des Elektronenstrahls
- die Qualität der Kathode, welche die Elektronen emittiert
- der Arbeitsabstand zur Probenoberfläche
- die gewählte Vergrößerung
- die gewählte Dauer eines Scans – festgelegt durch den Scan Modus
- die Korrektur von Astigmatismus und Fokus

Eine höhere Auflösung des Bildes bedeutet eine technisch bedingt längere Scanzeit. In der Tabelle 1 ist der Zusammenhang zwischen der Auflösung des Bildes und der Scanzeit, für die einzelnen standardmäßig verwendeten Scan Modi 1-4, von dem institutseigenen REM dargestellt.

<b>Auflösung des Bildes in Pixeln</b>	<b>Modus 1 Pixelmittel 1 Scanzeit</b>	<b>Modus 2 Pixelmittel 3 Scanzeit</b>	<b>Modus 3 Pixelmittel 6 Scanzeit</b>	<b>Modus 4 Pixelmittel 9 Scanzeit</b>
<b>1024 x 768</b>	120 ms	370 ms	2,7 sec	20,4 sec
<b>3072 x 2304</b>	800 ms	3 sec	23,3 sec	3 min
<b>4096 x 2304</b>	1,4 sec	5,4 sec	41 sec	5,4 min
<b>8192 x 6144</b>	7,1 sec	23 sec	2,7 min	21,5 min

Tabelle 1: Bildauflösung, Scan Modus und korrelierende Scanzeit im REM  
Quelle: eigene Daten

Der Modus 1 und 2 sind zur Orientierung auf einer Probe notwendig, da sie schnell Bilder erzeugen. Der Modus 3 wird zum Einstellen der finalen Bildparameter, wie dem Fokus, dem Astigmatismus und dem Kontrastverhältnis verwendet. Für die fertigen Bilder wurde meistens der Modus 4 mit einer Auflösung von 1024 x 768 Pixeln oder 3072 x 2304 Pixeln verwendet, da diese Kombinationen ein gutes Verhältnis aus Bildqualität und Scanzeit bieten. Für einzelne Übersichtsaufnahmen einer ganzen Probe, wurde der Modus 4 mit einer gesamten Auflösung von 8192 x 6144 Pixeln benutzt, damit ein nachträgliches digitales Vergrößern ermöglicht wird. Um diese hochauflösenden Scans zu ermöglichen ist insbesondere die elektrische Leitfähigkeit der Probenoberfläche ein wichtiger Parameter. Schon kleine Defekte in der Goldschicht können Artefakte erzeugen, die mit zunehmender Vergrößerung und Scandauer stärker werden. Es treten verschiedene Arten von Artefakten auf. Die häufigsten Artefakte sind:

- überstrahlte Bereiche / Helligkeitsunterschiede
- Verzerrung des Bildes (Linien, Wellen)
- Bewegung (während des Scans)

Ein helleres Signal bedeutet, dass der Detektor aus diesem Bereich mehr Elektronen empfängt. Wenn der hellere Bereich erst im Laufe mehrerer Scans auftritt, dann deutet dies auf ein Problem mit der elektrischen Leitfähigkeit der Probe hin. Dieser hellere Bereich ist ein Bildartefakt (Abbildung 8, Bild A und B). Dieses Phänomen zeigt sich verstärkt bei längerer Scanzeit. Dieser Zusammenhang ist in Bild C und D der Abbildung 8 dargestellt. Die Scanzeit im Bild 3 beträgt 2,7 sec und im Bild 4 sind es 20,4 sec.

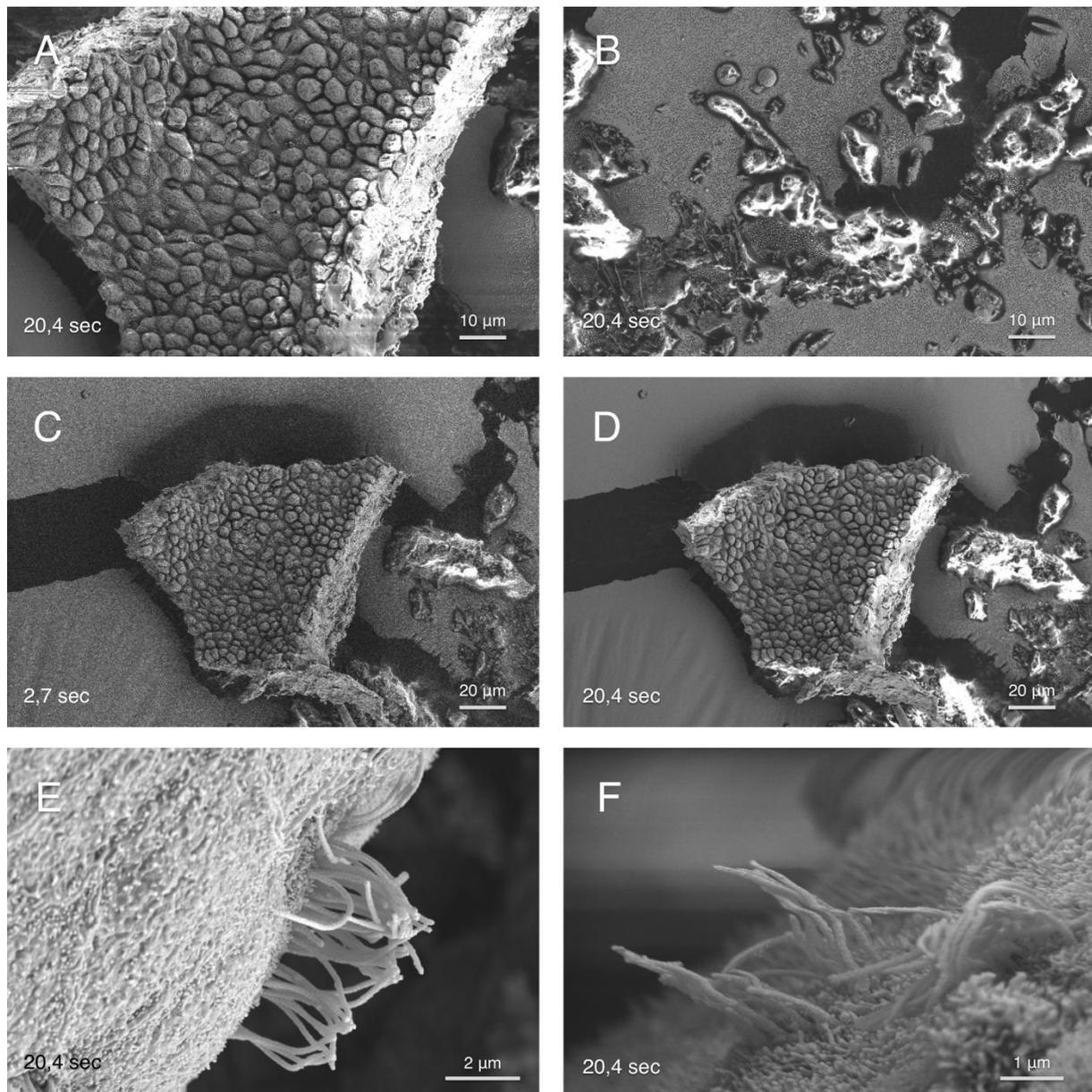


Abbildung 8: REM Proben mit ausgeprägten Bildartefakten ; Bild A und B: 1000 x Vergrößerung Modus 4, hell leuchtende Artefakte verstärkt am Rand der Probe; Bild C und D: Gegenüberstellung des Scan Modus 3 (Bild C) und des Scan Modus 4 (Bild D) bei 500x Vergrößerung; Bild E und F: Gegenüberstellung von Artefakten auf schrägen Oberflächen und mit unterschiedlicher Vergrößerung (8.000x Bild E, 13.450x Bild F) im Modus 4.

Quelle: eigene Bilder

Die elektrische Leitfähigkeit der Oberfläche ist bei filigranen Strukturen besonders wichtig. Zilien besitzen eine kleine Kontaktfläche zum Rest der Zelle, wodurch die Ableitung von Elektronen im Vergleich zu einer glatten Oberfläche erschwert ist. Bei multiziliären Zellen verstärkt sich das Problem der elektrischen Aufladung. Es entstehen bei hohen Vergrößerungen wellige Artefakte, sowie eine Unschärfe des Bildes, welche durch schräge Oberflächen zusätzlich verstärkt werden (Abbildung 8, Bild F). Bei der Untersuchung von multiziliären Zellen mit dem REM ist dieses Phänomen ein relevanter limitierender Faktor. Zusätzlich tritt bei multiziliären Zellen häufig eine Bewegung der Zilien unter dem laufenden

Scan auf, wodurch ebenfalls Artefakte entstehen. Gebogene Proben stellen eine zusätzliche Herausforderung dar, weil die vorderen Bereiche heller abgebildet werden, als der Hintergrund. Dies liegt daran, dass weniger Elektronen aus dem Hintergrund zum Detektor gelangen, woraufhin das REM diesen Abschnitt als dunkel darstellt (Abbildung 8, Bild E). Das gleiche Problem entsteht, wenn die Probe in der Oberfläche tiefe Löcher besitzt. In dieser Situation kann der Wechsel der Detektoren eine bessere Bildqualität bewirken (Abbildung 6).

### 2.2.4. Kontrolluntersuchung REM

---

Zur Kontrolle der Ergebnisse ist, bei der mit den REM maximalen verwendeten Vergrößerung von 20.000x, der Unterschied zwischen einer organischen Probe mit Mikrovilli und einem leeren Probenteller und mit reiner Goldoberfläche dargestellt worden (Abbildung 9). Der leere Probenteller im Bild B ist mit einer gleich dicken Goldschicht überzogen worden wie die Probe in Bild A. Anhand dieser Negativkontrolle kann bewiesen werden, dass die beobachteten Strukturen nicht durch den technischen Vorgang des Besputterns der Probe mit Gold entstanden sind, sondern der Topografie der organischen Probe entsprechen.

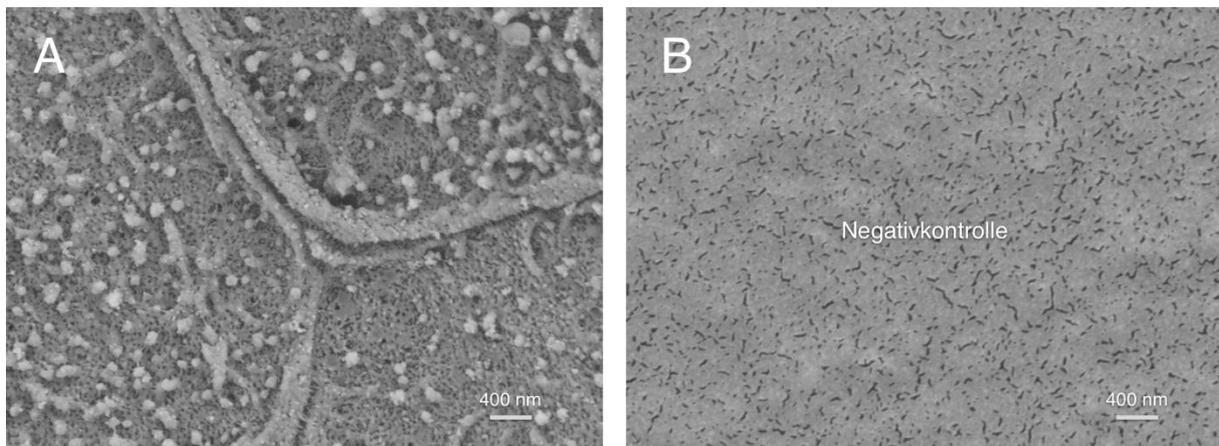


Abbildung 9: Negativkontrolle REM ; Bild A: Mikrovilli bei 20.000 x Vergrößerung Modus 4, Bild B: Negativkontrolle, ohne organische Probe, nur die Goldoberfläche des Probentellers bei 20.000 x; Quelle: eigene Bilder

### 2.2.5. Probenvorbereitung TEM

---

Die in Glutaraldehyd eingelegten Proben werden mit einer aufsteigenden Ethanol Reihe entwässert (Protokoll 3). Das Glutaraldehyd wird aus der Probe entfernt. Anschließend werden die Proben in LR - White oder in Epon Harz eingebettet. Das flüssige Epon-Harz wird in die gummierten Formen vorgelegt und die entwässerten organischen Proben hineingelegt. Im Falle des LR White werden das Fixativ und die Probe in eine Gelatine kapsel gefüllt und härten nur unter Luftabschluss aus. Damit eine spätere korrekte Zuordnung der organischen Probe gewährleistet werden kann, ist in jeder Form die passende Probennummer vorgelegt. Nach einer finalen Ausrichtung der Proben im Fixativ werden die Formen zum Aushärten in einen Ofen gestellt. Zu beachten ist, dass die Orientierung der Probe in dem Block (Lagekorrektur) nach dem Aushärten nicht mehr zu verändern ist. Der Prozess des Härtens dauert bei Epon mit 60 Grad Celsius oder bei LR White mit 50 Grad Celsius 2 bis 3 Tage. Anschließend werden die Blöcke aus der Form entfernt und in beschrifteten Boxen gelagert.

Die Aufgabe des Trimmens besteht darin, die ausgehärteten Blöcke für die Herstellung der Semidünnschnitte vorzubereiten. Die Semidünnschnitte werden hergestellt, um eine grobe Orientierung in der Probe unter dem Mikroskop zu ermöglichen. Der ausgehärtete Block wird in einer Trimmfräse mit einer rotierenden Diamantklinge getrimmt und im Anschluss in das Ultramikrotom der Firma Leica eingespannt. Die Schnittdicken sind variabel einzustellen. Im ersten Schritt werden Semidünnschnitte mit einer Dicke von 200 bis 500 nm angefertigt und auf einer destillierten Wasseroberfläche aufgefangen. Im nächsten Schritt werden die Dünnschnitte auf einen Objektträger übertragen und auf einer Heizplatte bei 80 Grad Celsius getrocknet. Um die Semidünnschnitte anzufärben wird Toloidin Blau verwendet. Dazu werden diese mit einer Pipette mit Toloidin Blau überzogen und nach 30 Sekunden in einem mit Wasser getränkten Glas gespült. Unter dem Lichtmikroskop wird beurteilt, ob der gewünschte Ausschnitt der Probe angeschnitten ist. Wird die entsprechende Stelle unter dem Mikroskop lokalisiert, können aus dem gleichen Probenblock Ultradünnschnitte mit einer Dicke von circa 50 bis 70 nm, für die TEM Untersuchung hergestellt werden. Diese Ultradünnschnitte werden im Wasserbad aufgefangen, mit dem „*Perfect Loop*“ aufgenommen und auf den Kupfergrids platziert (Bild B der Abbildung 4). Nur auf diesen Grids ist eine Untersuchung im TEM möglich. Sie bestehen aus einem Kupfergitter. Der Elektronenstrahl kann die Probe nur an den Stellen durchdringen, an denen keine Gitterstruktur vorhanden ist.

Biologische Proben besitzen in der Regel wenige metallische Elemente und sind daher im TEM kontrastarm. Um den Kontrast zu vergrößern, werden die biologischen Proben mit einem Kontrastmittel versehen. Wir verwenden Uranylacetat und Bleizitrat. Besonders die kleinen Strukturen innerhalb der Zellen werden dadurch darstellbar (Protokoll 4).

### **2.2.6. Funktionsweise des TEM**

---

Das TEM erzeugt einen hochenergetischen Elektronenstrahl, welcher mit einer Serie aus elektromagnetischen Linsen gebündelt und fokussiert wird. Die Probe befindet sich im Strahlengang. Der Detektor ist unter der Probe lokalisiert. Da der Elektronenstrahl eine wesentlich kleinere Wellenlänge von z.B. 0,0037 nm bei 100 kV Beschleunigungsspannung aufweist, sind deutlich höhere Vergrößerungen als mit sichtbarem Licht möglich (Michler 2019). Das verwendete TEM besitzt eine Auflösung bis zu 0.4 nm bei 80 kV Beschleunigungsspannung. Die Aufnahmen erfolgen mit einer CCD Kamera (1024x1024 Pixel). Der limitierende Faktor der Bildauflösung ist die digitale Kamera, welche den Elektronenstrahl in digitale Pixel umwandelt. Da die Auflösung der Kamera immer die gleiche bleibt, besitzen auch die Bilder die identische Auflösung unabhängig von der Vergrößerung.

### **2.2.7. Immunofluoreszenz mit dem Primärantikörper anti ac-Tub**

---

Die Immunofluoreszenz ist ein Verfahren der Lichtmikroskopie und verwendet zur Darstellung spezifischer Strukturen eine Kombination aus einem Primär- und Sekundärantikörper (Protokoll 7). Die maximale Vergrößerung mit 400 x des verwendeten Fluoreszenz Mikroskops ist im Vergleich zum TEM deutlich geringer. Vor der Einbettung im Paraffin wird die organische Probe schrittweise mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (Protokoll 5). Aufgrund der Probengröße von bis zu 3 cm erhöht sich die Zeit für die Entwässerung. Anschließend wird die mit Ethanol durchtränkte Probe mehrfach mit flüssigem Paraffin gespült, um das Ethanol auszuwaschen und um abschließend über mehrere Tage bei Raumtemperatur auszuhärten. Zur weiteren Verarbeitung werden die im Paraffin eingebetteten Proben mit einer Rasierklinge grob getrimmt und in das Mikrotom (Hyrax M 25 Zeiss GmbH) eingespannt. Die Schnitte mit einer Dicke von 7 und 10 µm werden in einem Wasserbad (Labocon Hofheim) aufgefangen, mit einem Objektträger aufgenommen und auf einer Heizplatte (Labocon Hofheim) mit 37 Grad Celsius getrocknet. Dieser Vorgang fixiert die Schnitte auf dem Objektträger. Die Temperatur sollte nicht 50 Grad überschreiten, damit es zu keiner Denaturierung der organischen Schnitte kommt. Für die Bindung der Primärantikörper in der IF sind, im Gegensatz zur REM und TEM Untersuchung, intakte Proteine eine Voraussetzung. Bevor die Proben mit den Antikörpern versetzt werden, erfolgt das Entparaffinieren (Protokoll 6). Es werden die Chemikalien Roti Histol und Xylol verwendet. Diese beiden Substanzen besitzen bei Anregung mit blauem Licht eine starke Autofluoreszenz im grünen Bereich. Dieser Effekt wurde genutzt, um antikörperunabhängig die Orientierung auf der Probe zu erleichtern. Die Anfärbung der Proben erfolgt mit Toluidin Blau. Mit einer Pipette wird die Probe betropft und nach 30 Sekunden in

einem Glas mit Wasser gespült. Die Schnitte werden im Lichtmikroskop beurteilt. Wenn die Trachea vollständig angeschnitten ist, erfolgt im nächsten Arbeitsschritt die Färbung mit der IF an noch ungefärbten Schnitten derselben Serie.

Nachdem die Primär – und Sekundärantikörper auf der Probe gebunden haben und die nicht gebundenen Antikörper abgespült worden sind, erfolgt im Mikroskop die spezifische Anregung der fluoreszierenden Substanz (Alexa Fluor 594 carboxylic acid), welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Die Anregung mit Licht der Wellenlänge von 591 nm und einer Helligkeit von 30 bis 50 % der maximalen Anregungsintensität des Fluoreszenz Mikroskops führt zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 614 nm, welche durch die Optik des Mikroskops vergrößert und mit einem Sensor (Kamera oder menschliches Auge) detektiert wird.

Es existieren für die Untersuchung des embryonalen respiratorischen Epithels noch keine Empfehlungen für die zu verwendende Konzentration des Primärantikörpers. Aus diesem Grund musste vor der systematischen Untersuchung des Flimmerepithels zuerst die optimale Konzentration des primären Antikörpers anti ac-Tub in verschiedenen Versuchsreihen bestimmt werden. Es hat sich herausgestellt, dass für den primären Antikörper anti ac-Tub bei einer Verdünnung von 1:1000 das beste Verhältnis aus spezifischer und unspezifischer Bindung gegeben ist. Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Schnittdicken von 10 µm verwendet. In der Tabelle 2 sind die verwendeten Parameter der IF aufgelistet.

<b>Schnittdicke</b>	10 µm
<b>Entparaffinieren</b>	Roti Histol
<b>primäre Antikörper mit Verdünnung</b>	anti ac-Tub 1:1000
<b>sekundärer Antikörper mit Verdünnung</b>	Anti mouse 1:300

Tabelle 2: Zusammenfassung der IF Untersuchungsparameter  
Quelle: eigene Daten

### 3. Ergebnisse

---

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Analyse der Oberflächenstruktur von embryonalen respiratorischen Epithelzellen im Bereich der Trachea systematisch dargestellt. In den Stadien E14 bis E18 erfolgte alle 24 Stunden die elektronenmikroskopische Untersuchung mit dem REM und dem TEM sowie die immunhistochemische Untersuchung mit der IF. In den Stadien von E14 bis E16 fand zusätzlich alle 12 Stunden die Untersuchung der Embryonen mit dem REM statt. Dieses Untersuchungsmuster ermöglichte die engmaschige Erfassung der Veränderungen an der Epitheloberfläche, da innerhalb von 12 Stunden bereits gravierende Unterschiede in der Entwicklung der respiratorischen Epithelzellen vorhanden sind.

Es wurden pro Entwicklungsstadium Proben aus den kranialen und kaudalen Abschnitten der Trachea systematisch analysiert. Während der Entwicklung des respiratorischen Epithels zeigte sich sowohl im kranialen als auch im kaudalen Abschnitt, ein ähnliches Entwicklungsmuster. Die multiziliären Zellen treten im Laufe der Entwicklung in Clustern auf, welche in späteren embryonalen Entwicklungsstadien an Größe zunehmen und ab E18 flächendeckend ineinander übergehen. Dies bedeutet, dass einige Zellgruppen regional sowohl im kranialen als auch im kaudalen Abschnitt der Trachea circa 1 bis 2 Tage weiter in der Entwicklung vorangeschritten sind als direkt benachbarte Zellgruppen. Diese lokale Clusterbildung ist im gesamten Entwicklungsverlauf stark ausgeprägt und kaschiert somit einen etwaigen kraniokaudalen Entwicklungsgradienten. Aus diesem Grund wurden im folgenden Abschnitt repräsentative REM und TEM Aufnahmen ausgewählt, welche die dominierenden Merkmale zu den jeweiligen embryonalen Entwicklungszeitpunkten repräsentieren. Die Ergebnisse erheben nicht den Anspruch statistisch signifikant zu sein.

Im Abschnitt 3.1 wird chronologisch, in jedem embryonalen Entwicklungsstadium, das zeitliche Auftreten von monoziliären Zellen und multiziliären Zellen, sowie deren Besatz mit Mikrovilli beschrieben.

Im Abschnitt 3.2 werden die Besonderheiten in der Ausprägung und Verteilung der multiziliären Zellen im respiratorischen Epithel erläutert.

### 3.1. Zeitlicher Entwicklungsverlauf des respiratorischen Epithels

---

#### 3.1.1. Embryonales Entwicklungsalter E 14

---

Am ersten untersuchten embryonalen Entwicklungstag E 14 befinden sich an der Oberfläche der meisten Zellen des respiratorischen Epithels einzelne kurze Monozilien. In der Übersichtsaufnahme im Bild A der Abbildung 10 sind exemplarisch einzelne Monozilien, welche circa 1 bis 4  $\mu\text{m}$  lang sind, mit weißen Kreisen hervorgehoben. Sehr rarefiziert finden sich auch Zellen ohne ein Monozilium an der Epitheloberfläche. Die Zellen in diesem Entwicklungsstadium sind unterschiedlich groß und die Zellgrenzen der individuellen Epithelzellen sind irregulär konturiert.

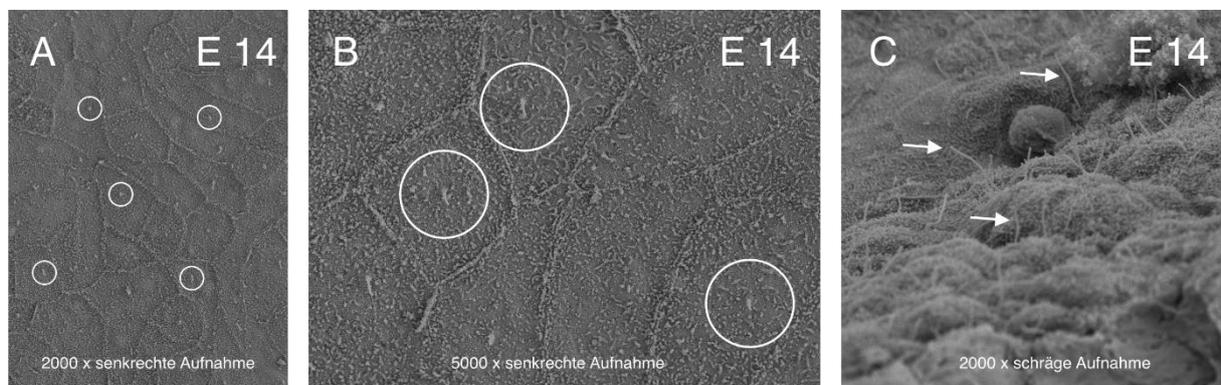


Abbildung 10: REM Untersuchung der Trachea E14; Bild A: REM Aufnahme des respiratorischen Epithels mit 2000x Vergrößerung; Bild B: REM Aufnahme des respiratorischen Epithels mit 5000x Vergrößerung; Bild C: schräge REM Aufnahme des respiratorischen Epithels mit 2000x Vergrößerung; Quelle: eigene Bilder

In der vergrößerten Aufnahme im Bild B der Abbildung 10 wird deutlich, dass die einzelnen Monozilien eine unterschiedliche Länge aufweisen. Exemplarisch sind drei längere Zilien mit einem weißen Kreis markiert. Die Zelloberfläche ist glatt und besitzt einige kurze Mikrovilli. Die einzelnen Zellgrenzen lassen sich bei 5000 x Vergrößerung klar definieren und sind gering erhaben gegenüber der normalen Zelloberfläche. Um die tatsächliche Länge der einzelnen Zilien besser beurteilen zu können, wird im Bild C der Abbildung 10 das respiratorische Epithel mit 2000 x Vergrößerung seitlich erfasst. In dieser Aufnahme sind die schlank konfigurierten Monozilien (Bild C, weißer Pfeil) mit ihrer unterschiedlichen Länge im Zellverband sichtbar. Aufgrund der Biegung der Trachea sind die einzelnen Zilien im Bildvordergrund und im Hintergrund methodenbedingt unscharf abgebildet. Daher ist eine exakte Bestimmung der Länge der Monozilien im Zellverband nicht sinnvoll durchzuführen. Multiziliäre Zellen sind im Entwicklungsstadium E 14 nicht vorhanden.

Mit dem TEM wurden die intrazellulären Strukturen von dem gleichen Tier im Stadium E14 ebenfalls untersucht (Abbildung 11). In dem Bild A der Abbildung 11 sind drei Zellen des respiratorischen Epithels erfasst. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 1000 nm. Der schwarze Pfeil markiert einen Basalkörper mit einem aussprossenden Zilium. Dieses Zilium verlässt methodenbedingt die Schnittebene. Eine Längenbestimmung des abgebildeten Monoziliums ist somit nicht möglich. Im Zytoplasma der erfassten Zellen befinden sich keine weiteren Basalkörper oder Zentriolen.

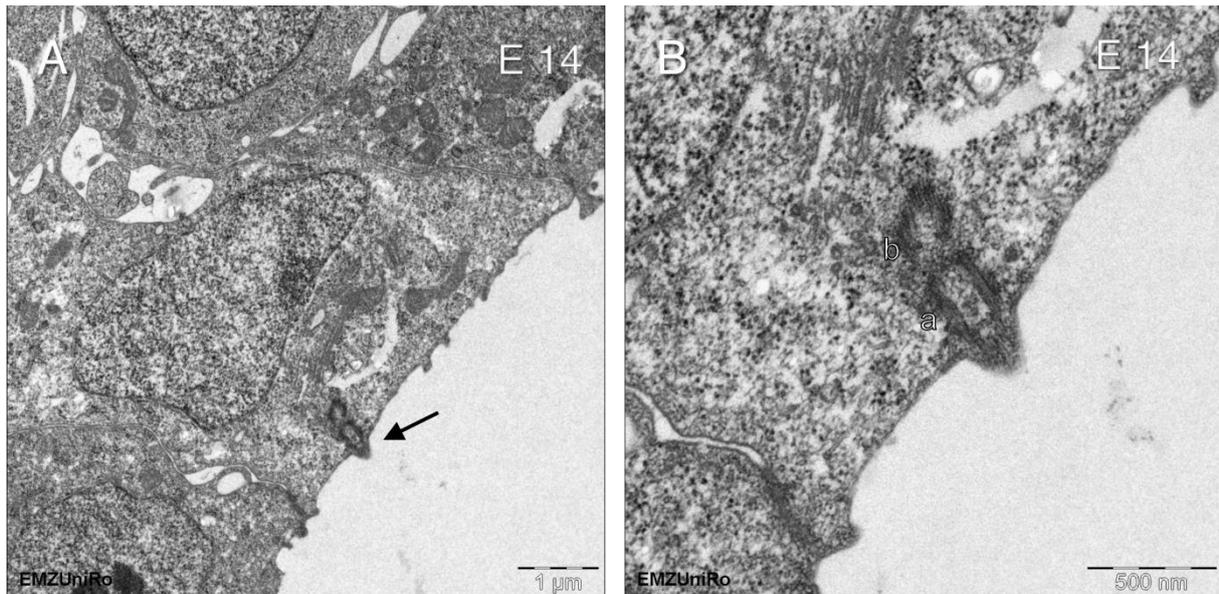


Abbildung 11: TEM Untersuchung der Trachea E14 ; Bild A: Maßstabsbalken entspricht 1µm, schwarzer Pfeil markiert Basalkörper mit Monozilium; Bild B: Maßstabsbalken entspricht 500 nm, a = Basalkörper, b = Tochterzentriole; Quelle: eigene Bilder

Das Bild B der Abbildung 11 ist ein vergrößerter Ausschnitt der monozyliären Zelle. Es zeigt sich der einzelne Basalkörper in typischer Lokalisation unter der Zelloberfläche. Dieser besteht aus einer Mutterzentriole und einer Tochterzentriole. In der Nachbarschaft des Ziliums sind vereinzelte kurze Mikrovilli vorhanden, welche keinen Basalkörper unterhalb der Epitheloberfläche aufweisen. Die Zelloberfläche ist glatt und die erfassten Zellgrenzen sind nicht erhaben.

In der immunhistochemischen Untersuchung, basierend auf dem primären Antikörper anti ac-Tub, sind die kurzen Monozilien, welche im embryonalen Entwicklungsstadium E14 bereits existieren, nicht zu detektieren (Abbildung 12). Es zeigt sich an der Oberfläche (Bild A und B, weißer Pfeil) des respiratorischen Epithels der Trachea keine rote Fluoreszenz. Die Fluoreszenz in den tieferen Gewebeschichten ist nicht auf Zilien zurückzuführen. Es hat sich gezeigt, dass der verwendete Primärantikörper eine hohe Affinität zu den im Gewebe vorhandenen Blutgefäßen aufweist, wodurch die überstrahlte Fluoreszenz in beiden

Aufnahmen entstanden ist. Das ac-Tub ist auch in Neuronen vorhanden, welche sich als dünne rote fluoreszierende Linien unterhalb des mehrreihigen Epithels der Trachea zeigen.

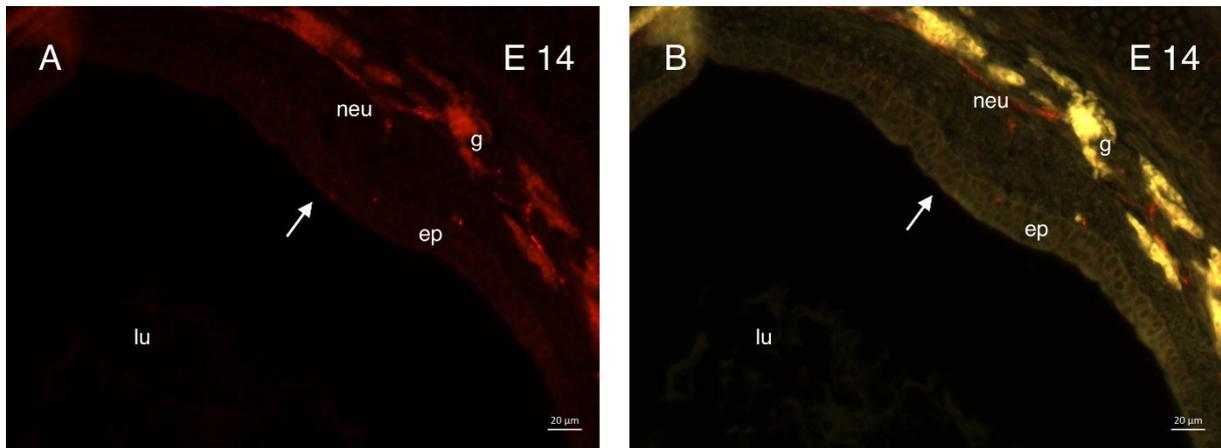


Abbildung 12: IF Untersuchung der Trachea E14 ; Bild A: primärer Antikörper anti ac-Tub; Bild B: primärer Antikörper anti ac-Tub mit grüner Eigenfluoreszenz der Probe; weißer Pfeil = Oberfläche des respiratorischen Epithels, lu = Lumen der Trachea, ep = mehrreihiges Epithel, g = Gefäß, neu = Neuron;  
Quelle: eigene Bilder

Zur besseren Orientierung der histologischen Strukturen der Probe ist in dem Bild B der Abbildung 12 zusätzlich die Eigenfluoreszenz der Probe mit dargestellt. In dem Bild B lässt sich eindeutig das mehrreihige Epithel erkennen. Das Lumen der Trachea enthält keine Zellen und keine Antikörper bindenden Strukturen und ist daher schwarz.

### 3.1.2. Embryonales Entwicklungsalter E 14,5

---

Im embryonalen Entwicklungsstadium E 14,5 besteht weiterhin eine hohe Varianz in Bezug auf die Länge der einzelnen Monozilien. Es existieren im Zellverband sehr kurze Monozilien (Bild A und B, weißer Kreis) mit circa 1 – 2  $\mu\text{m}$  Länge, während direkt daneben längere monoziliäre Zellen (Bild A und B, weißer Pfeil) mit bis zu 6  $\mu\text{m}$  Länge zu beobachten sind (Abbildung 13).

In diesem Entwicklungsalter existieren die ersten unreifen multiziliären Zellen (Bild A und B, mcc). Diese sind gekennzeichnet durch eine unterschiedliche Länge der individuellen Zilien. Diese frühen multiziliären Zellen besitzen zwar eine kleinere Zelloberfläche als die monoziliären Zellen, weisen aber dennoch eine höhere Anzahl an Mikrovilli auf. Die Zellgrenzen der sich entwickelnden monoziliären und multiziliären Zellen sind gegenüber den anderen Zellen erhabener.

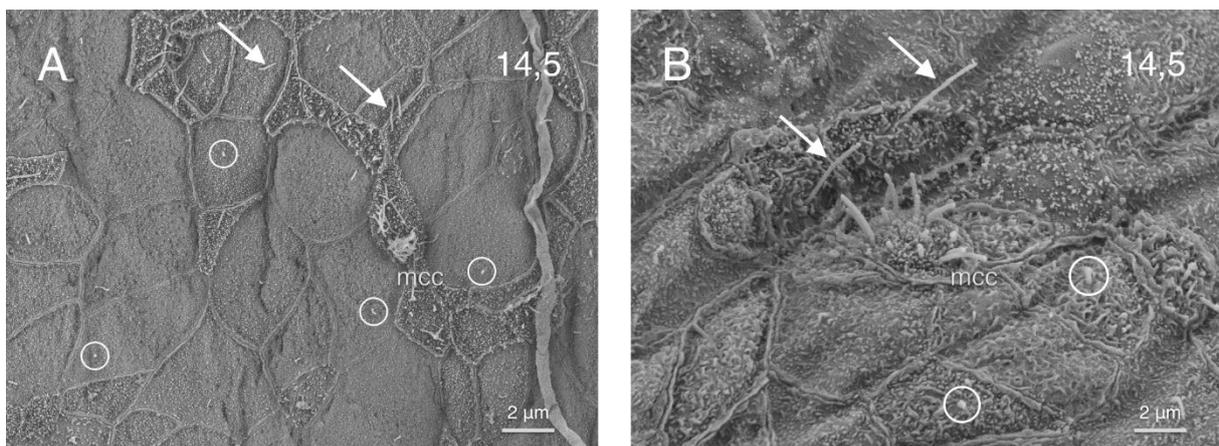


Abbildung 13: REM Untersuchung der Trachea E14,5 ; Bild A: REM Aufnahme des respiratorischen Epithels mit 2000 x Vergrößerung; Bild B: REM Aufnahme des respiratorischen Epithels mit 5000 x Vergrößerung; weißer Kreis = kurzes Monozilium, weißer Pfeil = langes Monozilium, mcc = multiziliäre Zelle;

Quelle: eigene Bilder

Im Zellverband befinden sich nur wenige multiziliäre Zellen. Somit imponiert deren Verteilung zufällig auf dem respiratorischen Epithel der embryonalen Trachea. In der Nachbarschaft der vorhandenen unreifen multiziliären Zellen befinden sich Zellen, welche eine erhabene Oberfläche aufweisen und verhältnismäßig mehr Mikrovilli besitzen.

### 3.1.3. Embryonales Entwicklungsalter E 15

Die Unterschiede der lokalen Entwicklung in Bezug auf die Verteilung der monoziliären und multiziliären Zellen im Zellverband und die Reifung der multiziliären Zellen, sind in diesem embryonalen Entwicklungsstadium deutlich sichtbar. Es zeigt sich, dass einige Abschnitte der Probe 12 bis 24 Stunden weiter in der Entwicklung sind als direkt benachbarte Abschnitte. Diese Unterschiede sind in den Bildern A und B der Abbildung 14 gegenübergestellt. In dem Bild A der Abbildung 14 ist ein Ausschnitt des respiratorischen Epithels dargestellt, welcher hauptsächlich monoziliäre Zellen und einige wenige multiziliäre Zellen aufweist. Die Länge der Monozilien ist weiterhin sehr unterschiedlich ausgeprägt. Zur Visualisierung der kürzeren Monozilien sind einzelne dieser Monozilien mit weißen Kreisen markiert.

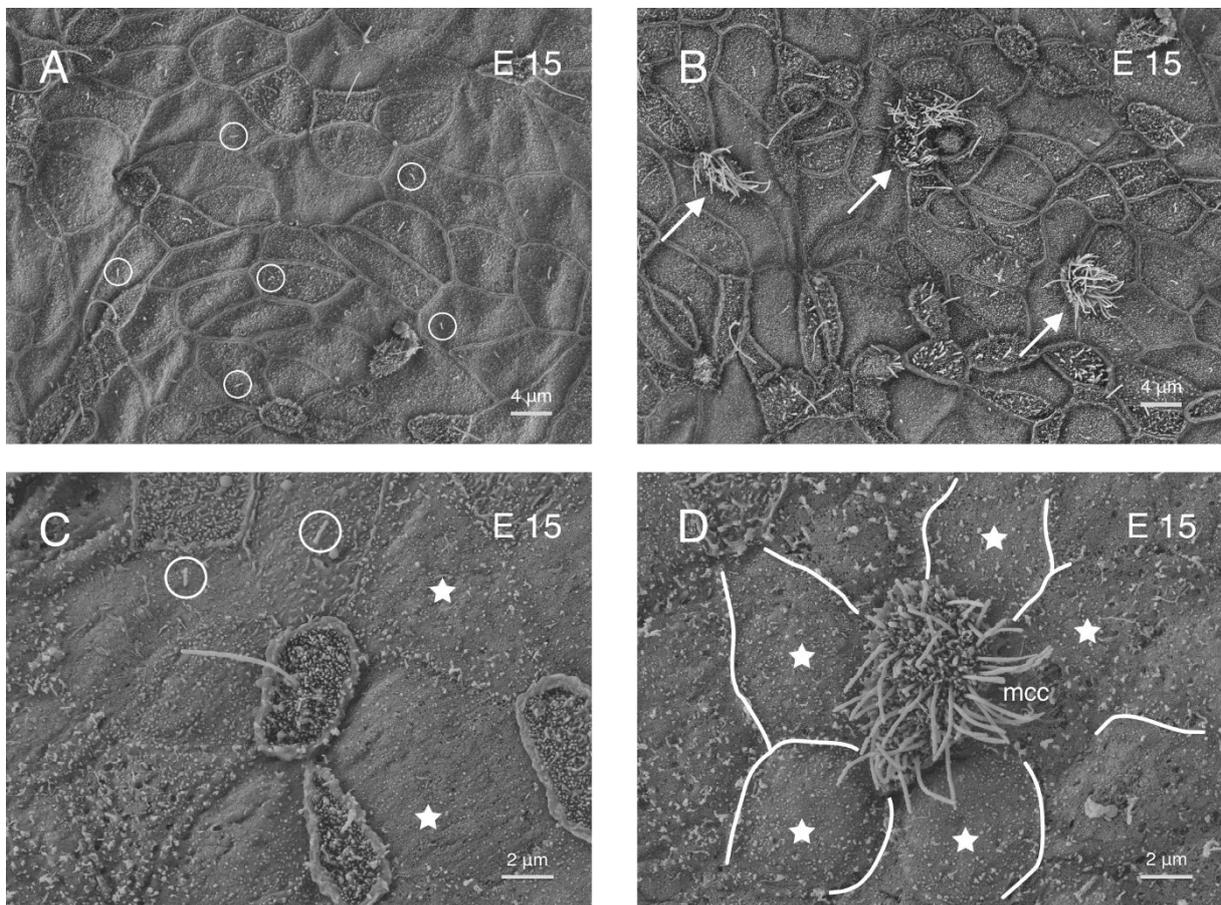


Abbildung 14: REM Untersuchung der Trachea E15 ; Bild A: monoziliäre Zellen mit 2000 x Vergrößerung, weißer Kreis markiert einzelne Monozilien; Bild B: Cluster von multiziliären Zellen mit 2000 x Vergrößerung, weißer Pfeil markiert eine multiziliäre Zelle; Bild C: monoziliäre Zelle mit Mikrovilli bei 5000 x Vergrößerung, weißer Kreis markiert einzelne Monozilien, weißer Stern = Zellen ohne Zilium; Bild D: einzelne multiziliäre Zelle mit Mikrovilli bei 5000 x Vergrößerung, weißer Stern = Zellen ohne Zilium, weiße Linien = Zellgrenzen;

Quelle: eigene Bilder

In dem Bild B der Abbildung 14 ist ein benachbarter Ausschnitt des respiratorischen Epithels erfasst. In diesem Bereich des respiratorischen Epithels ist eine deutlich höhere Anzahl an multiziliären Zellen vorhanden. Einzelne multiziliäre Zellen weisen deutlich längere Zilien als andere auf. Es zeigt sich, dass diese multiziliären Zellen (Bild B, weißer Pfeil) nicht gleichmäßig über die Oberfläche des respiratorischen Epithels verteilt sind, sondern in kleinen Clustern auftreten. Die einzelnen multiziliären Cluster sind zwischen den monoziliären Zellen streifenförmig verteilt. Im Zentrum dieser Cluster besitzen die multiziliären Zellen mehr und längere Zilien als die multiziliären Zellen am Rand des Clusters.

Die Vergrößerungen in dem Bild C und Bild D der Abbildung 14 zeigen Bereiche zwischen diesen multiziliären Clustern. Auf dem embryonalen respiratorischen Epithel befinden sich sporadisch verteilt Anordnungen von Epithelzellen, welche durch eine zentrale Zelle mit kleiner Oberfläche und erhabenen Zellgrenzen, sowie radiär umgebenden großen flachen Zellen, gekennzeichnet sind (Bild C). Die zentrale Zelle besitzt ein circa 6  $\mu\text{m}$  langes Zilium, der Besatz mit Mikrovilli hat zugenommen und die Zellgrenzen sind gegenüber den umgebenden Zellen erhabener. Auffällig ist, dass zwei der benachbarten Zellen (weißer Stern) gar kein Zilium, also weder ein einzelnes Monozilium, noch multiple Zilien besitzen. Die anderen zwei Zellen weisen jeweils nur ein sehr kurzes Zilium auf (Bild A, weißer Kreis).

Im Bild D der Abbildung 14 befindet sich eine alleinstehende weiter entwickelte multiziliäre Zelle, welche nicht Teil eines multiziliären Clusters ist. Die einzelnen Zilien sind im Vergleich mit einer frühen multiziliären Zelle länger und zahlreicher. Auffällig ist, dass 5 der umgebenden 7 Epithelzellen kein Zilium an der Oberfläche besitzen (Bild B, weißer Stern). Da das REM die intrazellulären Strukturen nicht darstellen kann, erfolgte im weiteren Schritt die TEM Untersuchung.

In dem Bild A der Abbildung 15 sind zwei nebeneinander liegende Zellen im gleichen embryonalen Entwicklungsalter, jedoch in unterschiedlichen Entwicklungsphasen dargestellt. In der linken Zelle zeigen sich in der erfassten Schnittebene noch keine Zilien an der Zelloberfläche. Im Zytoplasma sind bereits zahlreiche Zentriolen in unterschiedlicher Entfernung zur Zelloberfläche zu erkennen. Der weiße Kreis markiert eine Region in der die Zentriolen gebildet werden, welche anschließend in Richtung der Zelloberfläche migrieren. In der benachbarten rechten Zelle sind die Zentriolen bereits an die Zelloberfläche angedockt und zu Basalkörpern geworden. Die rechte Zelle hat bereits multiple Zilien und Mikrovilli an ihrer Oberfläche ausgebildet. Der schwarze Pfeil markiert die erhabene Zellgrenze der multiziliären Zelle.

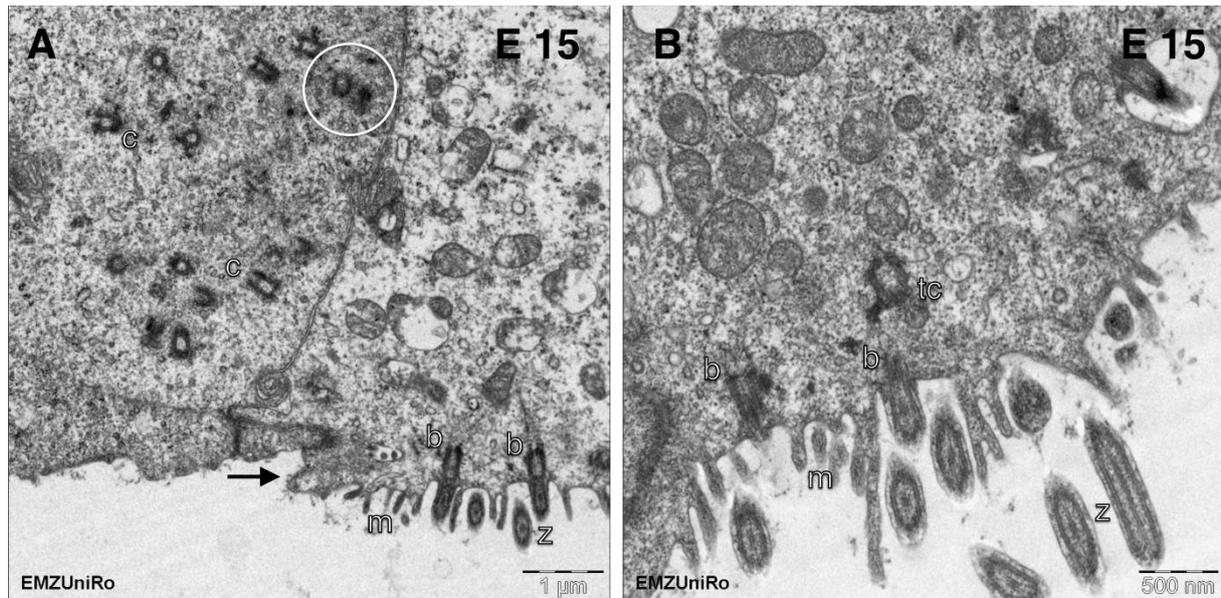


Abbildung 15: TEM Untersuchung der Trachea E15 ; Bild A: Zwei Zellen in unterschiedlichen Phasen der Ziliogenese, der Maßstabsbalken entspricht 1000 nm, weißer Kreis = Perizentrioläre Matrix; Bild B: eine multiziliäre Zelle mit Mikrovilli, der Maßstabsbalken entspricht 500 nm; b = Basalkörper, c = Zentriolen, tc = Tochterzentriole, m = Mikrovilli, z = Zilium; Quelle: eigene Bilder

Im Bild B der Abbildung 15 ist eine einzelne multiziliäre Zelle vergrößert dargestellt. Es zeigt sich, dass die Anzahl und Länge der Mikrovilli, im Vergleich zur TEM Untersuchung aus dem Stadium E 14, zugenommen hat. Die Anzahl der Zilien dieser multiziliären Zelle ist erhöht. Einige Zilien lassen im Längsschnitt die 9 + 2 Ultrastruktur vermuten, bevor sie im weiteren Verlauf die Schnittebene verlassen. Der ultrastrukturelle Unterschied zwischen den Zilien und den Mikrovilli ist deutlich zu erkennen. Im Zytoplasma befinden sich Basalkörper und weitere oberflächennahe Zentriolen.

### 3.1.4. Embryonales Entwicklungsalter E 15,5

---

Im embryonalen Entwicklungsstadium E 15,5 haben sich bereits 12 Stunden später die einzelnen multiziliären Cluster in der Fläche vergrößert, es sind neue Cluster dazu gekommen und innerhalb der Cluster befinden sich deutlich weiter entwickelte multiziliäre Zellen mit längeren Zilien. Je nach der untersuchten Region des respiratorischen Epithels ist die Größe der multiziliären Cluster und somit die Anzahl der verbleibenden monoziliären Zellen (weißer Kreis, Bild A der Abbildung 16) variabel. In der direkten Nachbarschaft dieser multiziliären Cluster befinden sich weiterhin Zellen, welche nur ein langes Monozilium tragen. Diese Zellen sind verglichen mit den umliegenden Zellen flach und haben nur wenige Mikrovilli (Abbildung 16).

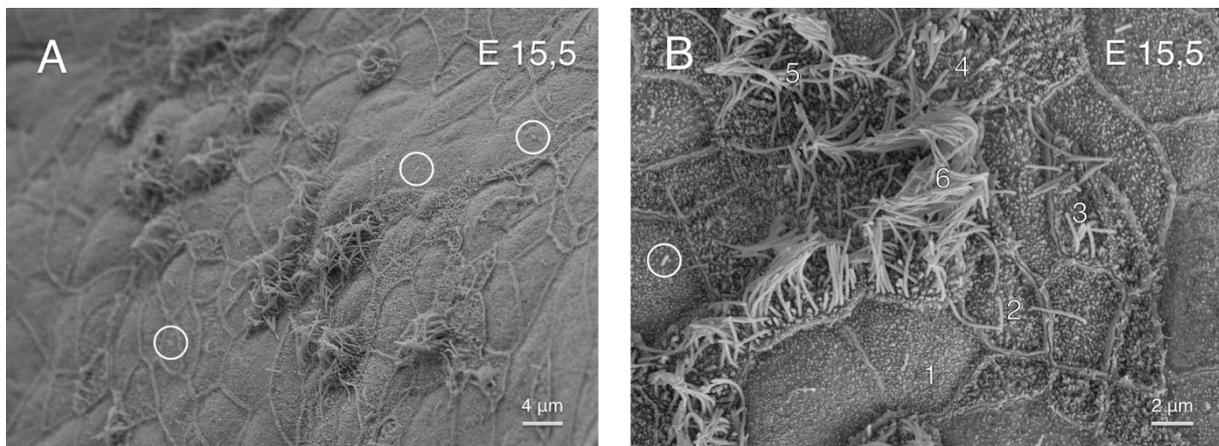


Abbildung 16: REM Untersuchung der Trachea E15,5 ; Bild A: 2000 x Vergrößerung, Cluster multiziliärer Zellen, weißer Kreis markiert exemplarisch kurze Monozilien; Bild B: 4000x Vergrößerung; 1 und 2 = monoziliäre Zellen, 3 bis 6 multiziliäre Zellen; Quelle: eigene Bilder

In dem Bild B der Abbildung 16 ist ein vergrößerter Ausschnitt eines multiziliären Clusters mit den Randbereichen erfasst. Im Zentrum (Bild B, Nummer 6) befindet sich die am weitesten entwickelte multiziliäre Zelle, welche die meisten und die längsten Zilien besitzt. Die umgebenden multiziliären Zellen (Bild B, Nummer 3 bis 5) weisen weniger und kürzere Zilien auf. Die multiziliären Zellen sind in einer länglichen Form im Cluster angeordnet. In direkter Nachbarschaft befinden sich Zellen, welche ein Monozilium unterschiedlicher Länge tragen (Bild B, Nummer 1 und 2). Obwohl beide monoziliäre Zellen direkt an das multiziliäre Cluster angrenzen, weisen sie einen sichtbar unterschiedlichen Mikrovilli-Besatz und unterschiedliche hohe Zellgrenzen auf. Es zeigt sich, dass die multiziliären Cluster länglich konfiguriert sind.

### 3.1.5. Embryonales Entwicklungsalter E 16

---

In den REM Aufnahmen der Abbildung 17 ist eine in der Fläche deutliche Zunahme der Anzahl der multiziliären Zellen erkennbar. Innerhalb von weiteren 12 Stunden, verglichen mit dem vorherigen Stadium E 15,5, gab es eine massive Zunahme der multiziliären Zellen. Insgesamt stellt E 16 einen Übergang dar, an dem die Bedeckung mit multiziliären Zellen erstmals größer ist als die Bedeckung mit monoziliären Zellen (Bild A und Bild B der Abbildung 17). Die vorher nur bei hohen Vergrößerungen sichtbare lokale Divergenz in der Ausprägung von multiziliären Zellen zeigt sich inzwischen auch bei geringeren Vergrößerungen. Neben den inzwischen großen multiziliären Clustern, befinden sich noch kleine Regionen, welche nur monoziliäre Zellen besitzen.

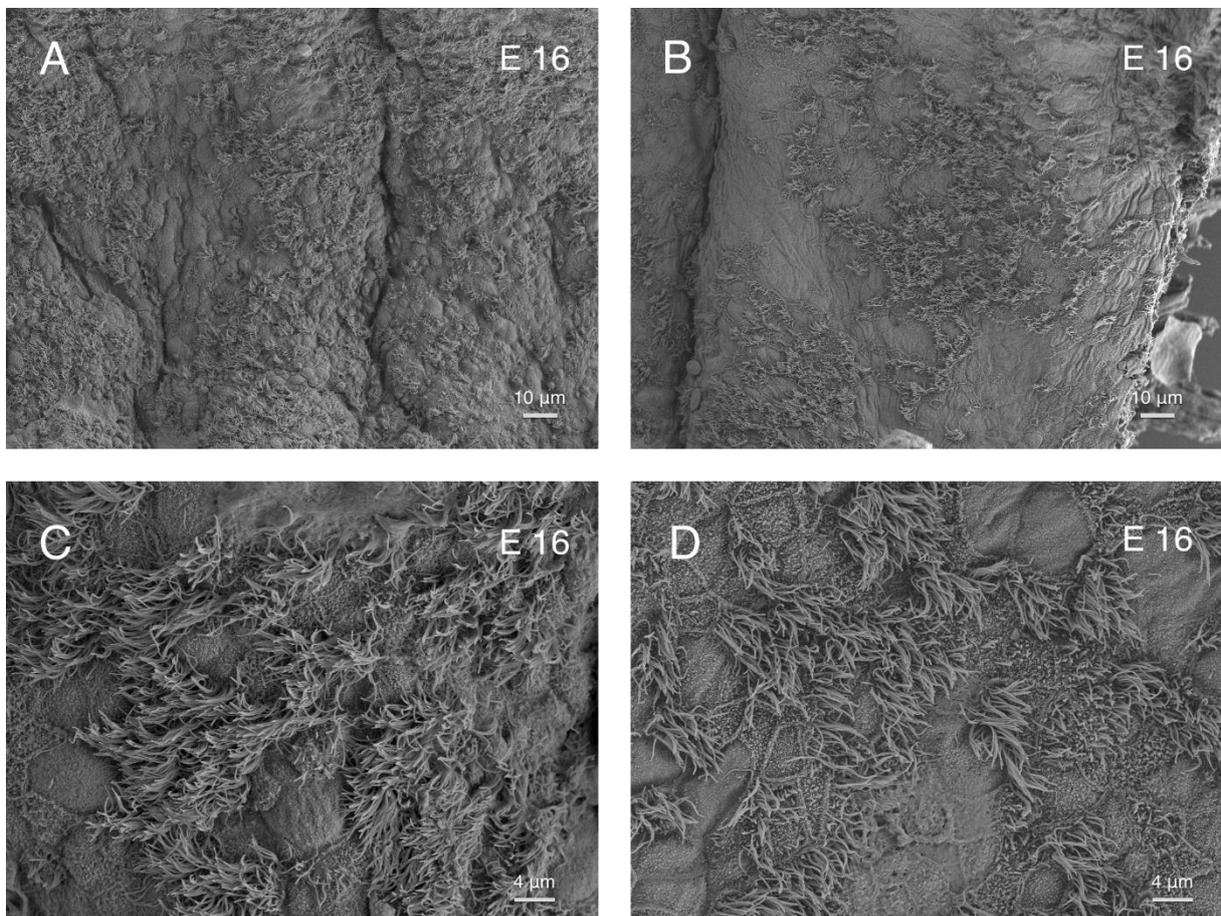


Abbildung 17: REM Untersuchung der Trachea E16 ; Bild A und Bild B: 500x Vergrößerung; Bild C und Bild D: 2000x Vergrößerung, Quelle: eigene Bilder

In den vergrößerten Ausschnitten (Bild C und Bild D der Abbildung 17) zeigt sich, dass die individuellen multiziliären Zellen sowohl mehr Zilien als auch längere Zilien aufweisen. Die einzelnen Zellen innerhalb eines multiziliären Clusters gleichen sich zunehmend einander an und bilden einen homogenen Besatz. Die Oberfläche dieser weiter entwickelten multiziliären

---



In der TEM Untersuchung des Stadiums E 16 wird die unterschiedliche Bedeckung mit Zilien auf der Zelloberfläche ebenfalls deutlich (Abbildung 19). Alle Bilder der Abbildung 19 stammen aus einem Ultradünnschnitt der gleichen Probe. Während im Bild A eine Zelle mit einem Monozilium erfasst ist, sind in den Bildern B und C multiziliäre Zellen mit einer progredienten Anzahl der einzelnen Zilien zu erkennen. Wie bereits mit den Methoden REM und IF nachgewiesen wurde, ist in Abhängigkeit von der untersuchten Lokalisation einer Probe, der Nachweis einer monoziliären Zelle oder einer multiziliären Zelle im Zellverband möglich.

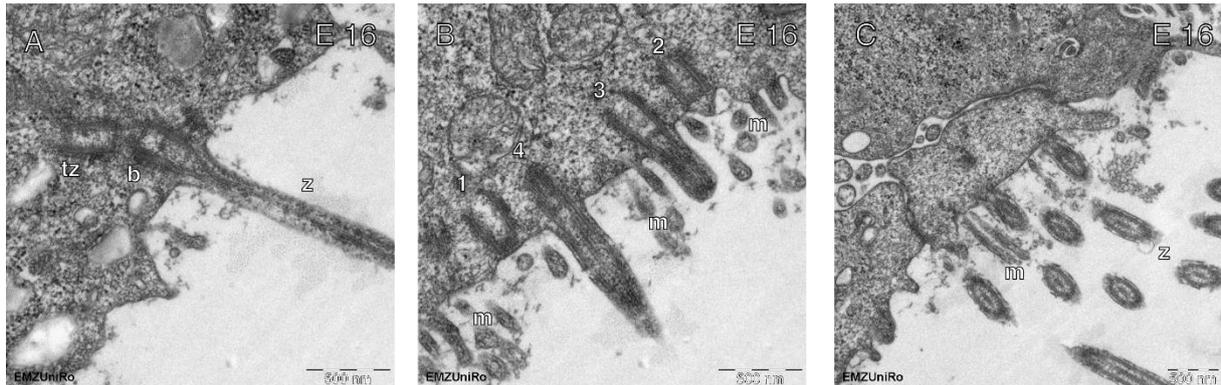


Abbildung 19: TEM Untersuchung der Trachea E16 ; der Maßstabsbalken entspricht 500 nm; Bild A: monoziliäre Zelle, b = Basalkörper, tz = Tochterzentriole, z = Zilium; Bild B: multiziliäre Zelle mit von 1 bis 4 nummerierten Entwicklungsphasen eines Ziliums, m = Mikrovilli; Bild C multiziliäre Zelle mit Mikrovilli, die meisten Zilien verlassen im Verlauf die Schnittebene; Quelle: eigene Bilder

Im Bild A der Abbildung 19 ist ein einzelnes langes Zilium mit dem Basalkörper und der Tochterzentriole im Längsschnitt dargestellt. Neben dem Zilium befinden sich einzelne Mikrovilli.

Im Bild B der Abbildung 19 ist eine multiziliäre Zelle mit unterschiedlich langen Zilien im Längsschnitt abgebildet. Die einzelnen Entwicklungsphasen des Aussprossens der Zilien sind fortlaufend von 1 bis 4 nummeriert. Nachdem der Basalkörper an der Zelloberfläche (Bild B, Nummer 1) angedockt hat, kommt es zur Aussprossung des Ziliums (Bild B, Nummer 2), mit anschließendem Längenwachstum (Bild B, Nummer 3). Das längere Zilium (Bild B, Nummer 4) verlässt die Schnittebene und ist daher nicht vollständig erfasst. Die Zelle besitzt zahlreiche Mikrovilli, welche sich zwischen den einzelnen Zilien befinden. Im Gegensatz zur REM Untersuchung bleibt die Zelloberfläche mit der TEM Untersuchung weiter beurteilbar.

Im Bild C der Abbildung 19 befindet sich eine, verglichen zu dem Bild B, weiterentwickelte multiziliäre Zelle. Diese besitzt eine größere Anzahl an Zilien, welche nur partiell in der Schnittebene liegen, sowie zahlreiche Mikrovilli zwischen den Zilien.

### 3.1.6. Embryonales Entwicklungsalter E 17

---

Im embryonalen Entwicklungsstadium E 17 nimmt die Anzahl der multiziliären Zellen im Zellverband weiter zu. Die multiziliären Cluster bedecken größere Areale und gehen an mehreren Stellen ineinander über (Abbildung 20). Die einzelnen multiziliären Zellen sind in ihrer Entwicklung fast abgeschlossen, was sich an der Länge und Anzahl der Zilien zeigt. Aufgrund der erhöhten Dichte an Zilien ist es innerhalb der Cluster mit dem REM nicht mehr möglich die individuelle Oberfläche einer multiziliären Zelle überlagerungsfrei darzustellen.

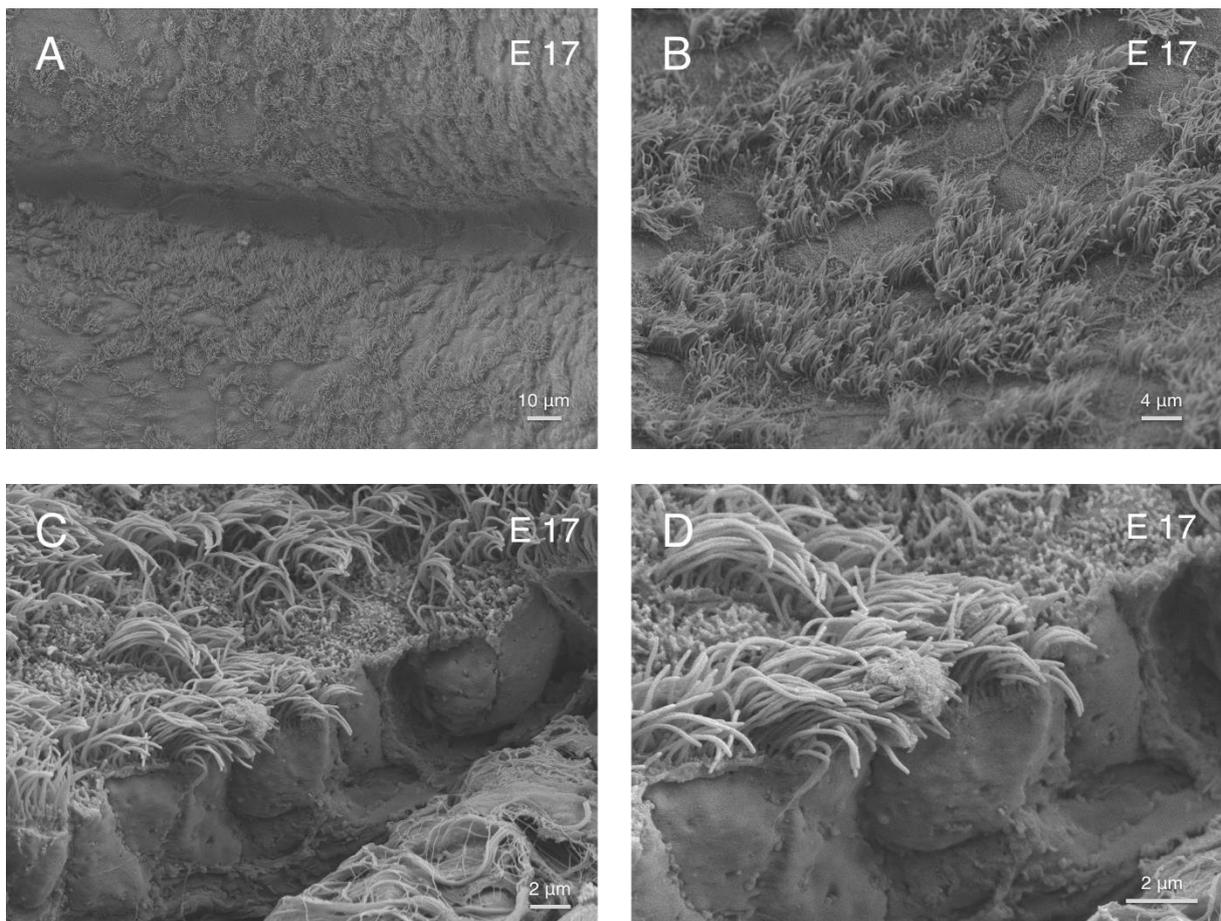


Abbildung 20: REM Untersuchung der Trachea E17 ; Bild A: 500 x Vergrößerung; Bild B: 2000x Vergrößerung; Bild C: 4000x Vergrößerung; Bild D: 7000x Vergrößerung; Quelle: eigene Bilder

Auch bei höheren Vergrößerungen und an den Bruchkanten ist die Zelloberfläche einzelner multiziliärer Zellen durch die Zilien überlagert. Im Stadium E17 befinden sich weiterhin, neben voll entwickelten multiziliären Zellen, benachbarte Zellen mit zahlreichen Mikrovilli an der Zelloberfläche, jedoch mit wenigen kurzen Zilien. Dies ist in den Bildern C und D der Abbildung 20 ersichtlich.

Mit der TEM Untersuchung lässt sich im Stadium E 17 die Oberfläche der multiziliären Zellen, weiterhin gut darstellen. In der Abbildung 21 ist in dem Bild B der deutliche Längenunterschied zwischen den zahlreichen Mikrovilli und den längeren Zilien veranschaulicht.

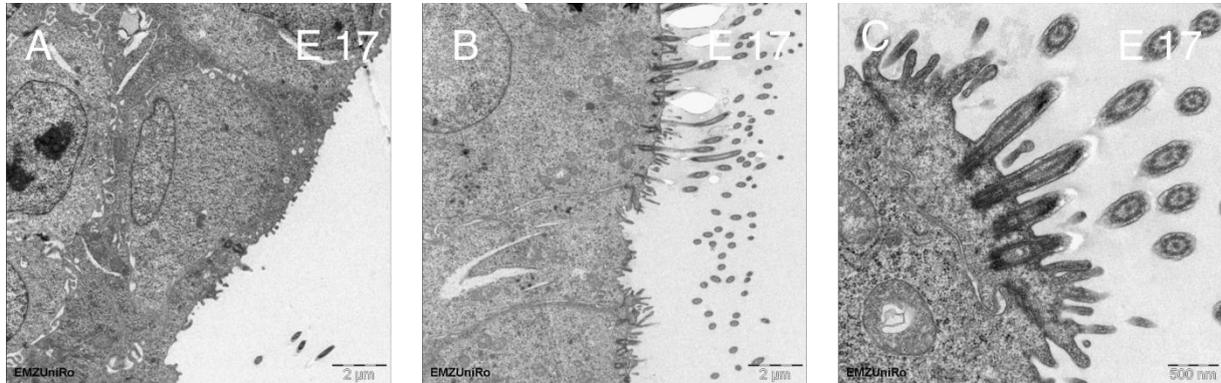


Abbildung 21: TEM Untersuchung der Trachea E17 ; Bild A: monoziliäre Zelle mit Mikrovilli; Bild B: multiziliäre Zellen mit zahlreichen Mikrovilli unterhalb der Zilien; Bild C: multiziliäre Zelle mit Mikrovilli in Nachbarschaft der Zilien; Quelle: eigene Bilder

Im Stadium E17 wurde mit der REM Untersuchung gezeigt, dass eine voll entwickelte multiziliäre Zelle dicht neben einer Zelle ohne Zilien existiert. Diese Zellen ohne Zilien besitzen jedoch zahlreiche Mikrovilli an der Oberfläche. Dieses Phänomen ist auch mit der TEM Untersuchung nachweisbar und in den Bildern A und C der Abbildung 21 verdeutlicht. Im Bild A ist nur ein Basalkörper in der Schnittebene abzugrenzen. Dafür besitzt die Zelle jedoch zahlreiche kurze Mikrovilli. Die Zelle im Bild C ist sichtbar weiterentwickelt und besitzt zahlreiche Basalkörper und Zilien sowie dazwischen einzelne Mikrovilli. Im Querschnitt der angeschnittenen Zilien zeigt sich dabei die typische 9+2 Ultrastruktur.

### 3.1.7. Embryonales Entwicklungsalter E 18

---

Im embryonalen Entwicklungsstadium E18 ist die Entwicklung der multiziliären Zellen des respiratorischen Epithels der Trachea weitestgehend komplettiert. In der REM Untersuchung zeigt sich ein flächiger Besatz mit multiziliären Zellen. Daraus ergibt sich, dass keine multiziliäre Clusterbildung mehr feststellbar ist (Abbildung 22).

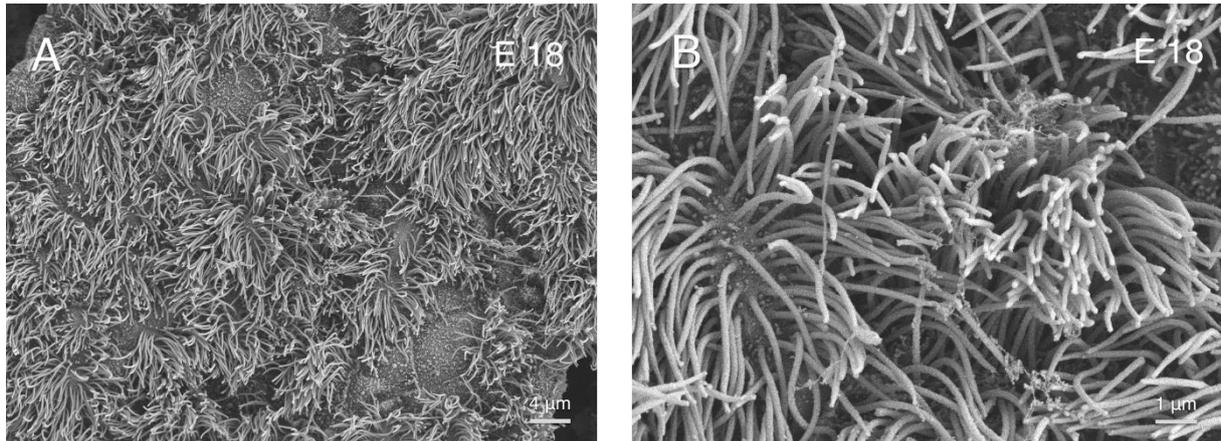


Abbildung 22: REM Untersuchung der Trachea E18 ; Bild A: 3000 x Vergrößerung, Bild B: 8000 x Vergrößerung, Quelle: eigene Bilder

In dem Bild A der Abbildung 22 zeigt sich bei 3000 x Vergrößerung ein größtenteils flächendeckender Besatz mit multiziliären Zellen. Die Anzahl der Zilien auf dem respiratorischen Epithel ist so groß geworden, dass sie sich in den Übersichtsaufnahmen gegenseitig überlagern. Einzelne Ausnahmen bilden zwei kleine Zellen mit zahlreichen Mikrovilli. In welche Zellart sich diese beiden Zellen entwickeln kann mit der REM Untersuchung nicht eindeutig festgelegt werden. Mit dem TEM ist in dem Bild C der Abbildung 23 eine sekretorische Zelle direkt neben einer multiziliären Zelle erfasst.

Bei Vergrößerungen ab 8000x ist mit dem REM vereinzelt die Zelloberfläche zwischen den Zilien zu erkennen, wie es in dem Bild B der Abbildung 22 veranschaulicht ist. Zwischen den langen Zilien der vergrößerten multiziliären Zelle zeigen sich die deutlich kürzeren Mikrovilli. Insgesamt stößt die REM Untersuchung ab diesem Entwicklungsstadium an ihre Grenzen, wenn es um die Beurteilbarkeit der Zelloberfläche bei höheren Vergrößerungen geht. Die hohe Anzahl an Zilien, welche die Oberfläche bedecken und dadurch erhebliche Bildartefakte, aufgrund von Aufladungseffekten, verursachen, limitieren die sinnvolle Vergrößerung der multiziliären Zellen mit unserem Gerät auf circa 8000x.

Mit der TEM Untersuchung zeigen sich im Stadium E 18 die unter der Zelloberfläche dicht an dicht aufgereihten Basalkörper. Im erfassten Zytoplasma sind, in dieser Schnittebene, keine freien Zentriolen mehr abgrenzbar. Über der Zelloberfläche befindet sich ein dichter Saum mit Zilien (Bild A und B der Abbildung 23).

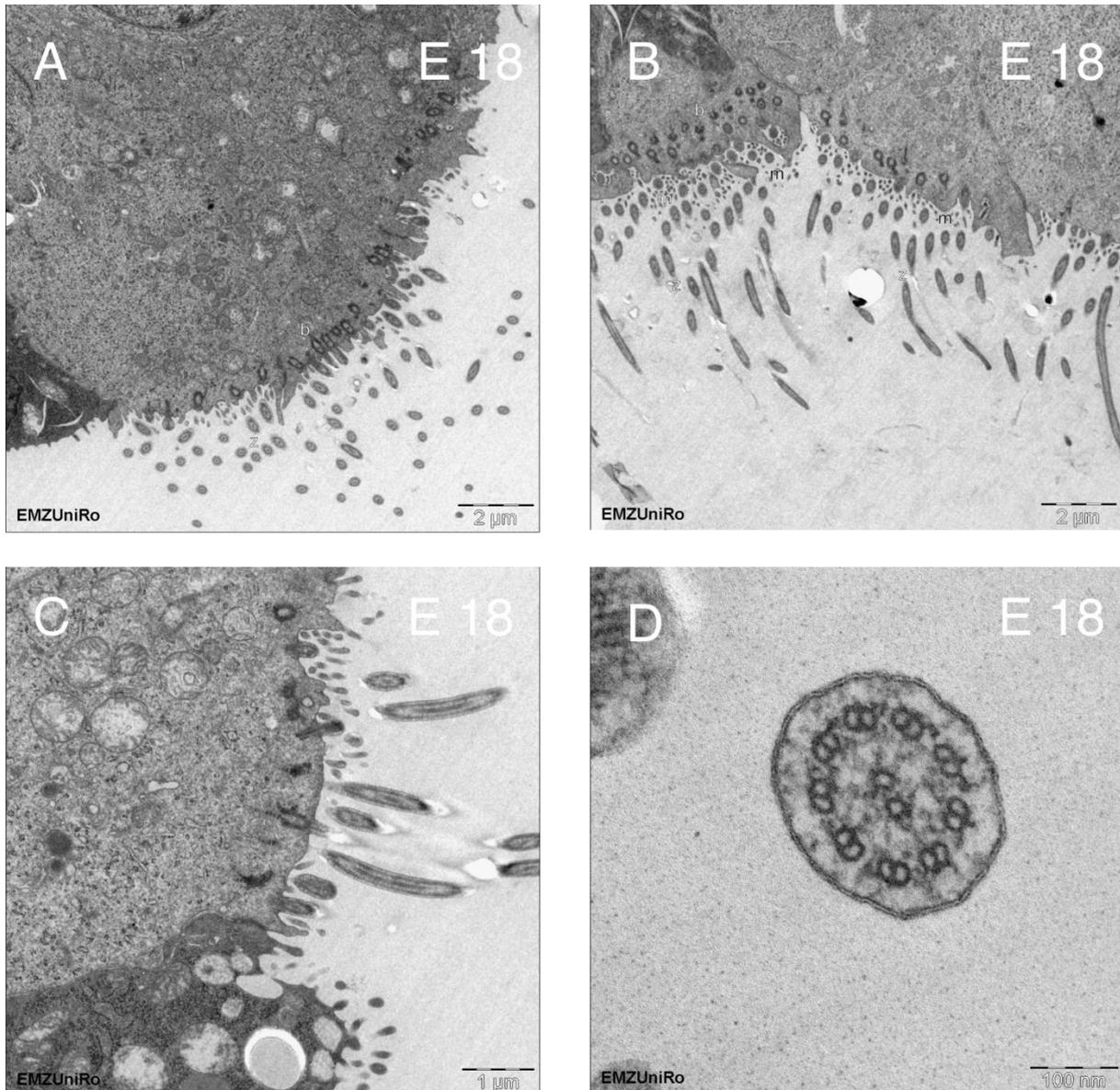


Abbildung 23: TEM Untersuchung der Trachea E18 ; Bild A und Bild B: multiziliäre Zelle, der Maßstabsbalken entspricht 2 µm; Bild C: multiziliäre Zelle und eine sekretorische Zelle, der Maßstabsbalken entspricht 1µm; Bild D: Querschnitt eines Kinoziliums, der Maßstabsbalken entspricht 100 nm; Basalkörper = b, Mikrovilli = m; Quelle: eigene Bilder

Im Bild C der Abbildung 23 befindet sich eine teilerfasste sekretorische Zelle, welche keine Zilien, dafür aber Mikrovilli an der Zelloberfläche besitzt. Im Zytoplasma dieser Zelle sind keine Zentriolen oder Basalkörper zu erkennen. Stattdessen sind größere Vesikel vorhanden,

welche sich unter der Zelloberfläche sammeln. Das Zytoplasma der sekretorischen Zelle ist nach der Kontrastierung dunkler als das Zytoplasma einer multiziliären Zelle.

Im Bild D der Abbildung 23 ist ein Querschnitt eines Ziliums mit der typischen 9+2 Ultrastruktur, den inneren und äußeren Dyneinarmen und den Radialspeichen dargestellt.

Mit der Methode der IF (Abbildung 24) zeigt sich im Entwicklungsstadium E 18 ein flächiger Besatz des respiratorischen Epithels (Bild A und B, ep) mit multiziliären Zellen (weißer Pfeil). Allerdings zeigen sich auch einige Ausnahmen (Bild A und B, f).

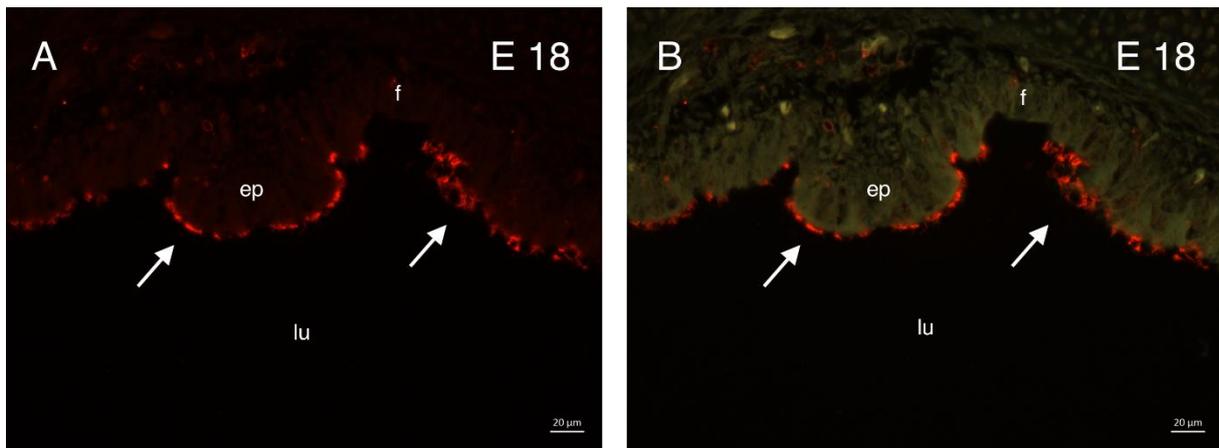


Abbildung 24: IF Untersuchung der Trachea E18 ; Bild A und Bild B anti ac-Tub, 400 x Vergrößerung, Bild B mit Background. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm; weißer Pfeil = multiziliäre Zellen, ep = respiratorisches Epithel, f = Furche, lu = lumen; Quelle: eigene Bilder

Der primäre Antikörper anti ac-Tub in Kombination mit dem sekundären Antikörper stellt die Zilien als rot leuchtenden Saum an der Epitheloberfläche (Bild A und B, ep) dar. Die Oberfläche einiger Proben des respiratorischen Epithels weist Furchen (Bild A und B, f) auf. Am Grund dieser Furchen ist der rot leuchtende Saum, welcher für das Vorhandensein von multiziliären Zellen steht, ausgespart. Dieses Phänomen ist ebenfalls in der REM Untersuchung zu beobachten und wird im Kapitel 3.2 detailliert erläutert. In dem Bild B der Abbildung 24 ist die zusätzliche Autofluoreszenz der Probe zur besseren Orientierung mit abgebildet.

### 3.2. Besonderheiten der Verteilung von multiziliären Zellen

---

Im Kapitel 3.1 wurde gezeigt, dass die multiziliären Zellen in der Entwicklung immer größer werdende Cluster ausbilden, welche im Stadium E18 vollständig miteinander verschmolzen sind. Jedoch existiert ein weiterer Faktor, welcher die Verteilung und Ausprägung der multiziliären Zellen beeinflusst. Dieser Faktor ist das Vorhandensein von Furchen im respiratorischen Epithel. In Abhängigkeit von der Tiefe der horizontalen Furchen im Epithel der Trachea tritt eine verminderte Ausprägung des multiziliären Wachstums auf. Dabei handelt es sich nicht um durch die Präparation verursachte Artefakte. Dieses Phänomen wurde eindeutig mit dem REM Untersuchung und der IF Untersuchung nachgewiesen.

Die Furchen sind sporadisch, sowohl in den kranialen Abschnitten, als auch in den kaudalen Abschnitten der Trachea, zu beobachten. Es existieren jedoch auch Proben ohne Furchen. Für einen Zusammenhang, zwischen dem Auftreten der Epithelfurchen und der kranialen oder kaudalen Untersuchungslokalisierung der embryonalen Trachea bestehen bisher keine eindeutigen Hinweise.

#### 3.2.1. Tiefe Furchen des embryonalen respiratorischen Epithels der Trachea

---

In der Abbildung 24 wurde bereits mit der Methode der IF gezeigt, dass am Grund von tiefen Furchen die Anzahl der multiziliären Zellen reduziert bzw. nicht nachweisbar ist. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurden folgende REM Aufnahmen erstellt. Am Grund von tiefen Furchen, welche sich zwischen zwei Knorpelringen befinden, zeigen sich keine oder nur einzelne multiziliäre Zellen. Dieses Phänomen ist sowohl im Entwicklungsstadium E17 (Abbildung 25), als auch im Entwicklungsstadium E18 (Abbildung 26) vorhanden.

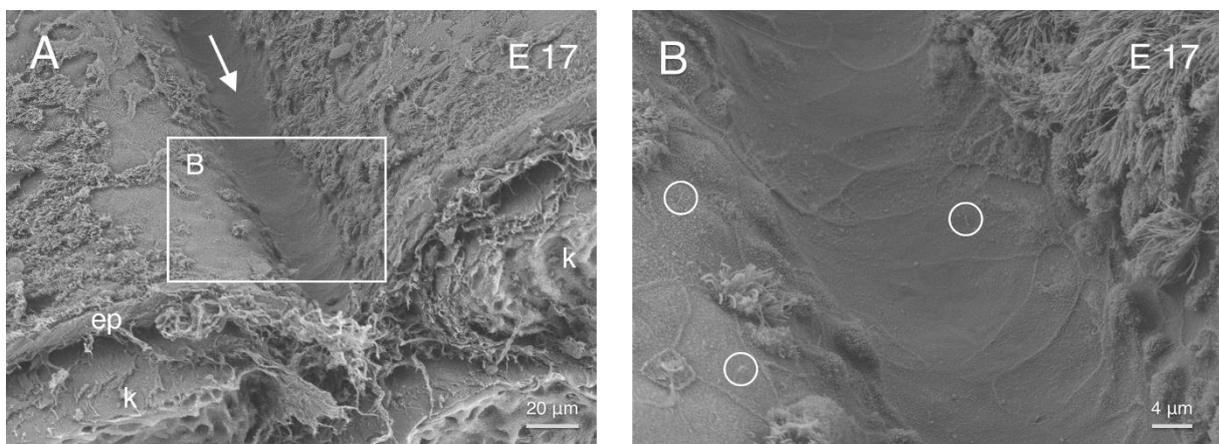


Abbildung 25: REM Untersuchung der Trachea E17 mit tiefen Epithelfurchen ; Bild A: 500 x Vergrößerung; Bild B: vergrößerter Ausschnitt aus Bild A mit 2000 x Vergrößerung, weißer Kreis markiert einzelne Zilien, k= Knorpelringe, ep = Epithel, weißer Pfeil = Furchengrund; Quelle: eigene Bilder

In der Übersichtsaufnahme in dem Bild A der Abbildung 25 sind der Grund der Epithelfurche sowie die angrenzenden beiden Knorpelringe dargestellt. An der Epitheloberfläche, sowie auch am Rand der tiefen Furche sind die multiziliären Cluster zu erkennen. Am Furchengrund befinden sich, im Gegensatz zu dem restlichen Epithel, keine multiziliären Zellen.

Im Bild B der Abbildung 25 ist ein mit 2000x vergrößerter Ausschnitt der Epithelfurche abgebildet. Multiziliäre Zellen sind am Grund nicht vorhanden. Der Besatz an Mikrovilli ist gering. Die Zellgrenzen am Grund der Epithelfurche sind erhaben. Die weißen Kreise markieren jeweils ein einzelnes Monozilium. Am Grund der tiefen Furche ist ein kurzes Monozilium vorhanden. Am Rand der Furche ist ein Bereich zwischen den multiziliären Clustern dargestellt. In diesem Abschnitt des respiratorischen Epithels ist die Anzahl der multiziliären Zellen wesentlich reduziert und es existieren einzelne monoziliäre Zellen. Im Gegensatz dazu ist der Rand auf der gegenüberliegenden Seite mit zahlreichen multiziliären Zellen eines multiziliären Clusters besetzt.

In der Probe aus dem Entwicklungsstadium E18 zeigt sich ebenfalls am Grund der tiefen Epithelfurche eine deutliche Reduktion der multiziliären Zellen. Dies steht im Stadium E 18 im starken Kontrast zu der restlichen Epitheloberfläche (Abbildung 26).

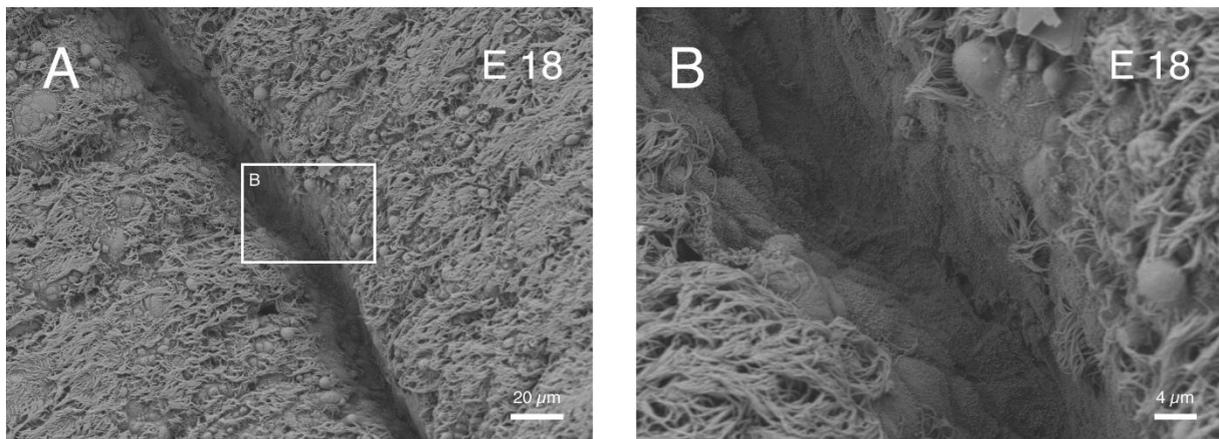


Abbildung 26: REM Untersuchung der Trachea E18 tiefe Furche , Bild A: Furche mit 500 x Vergrößerung, das weiße Rechteck entspricht dem vergrößerten Ausschnitt im Bild B; Bild B: Furche mit 2000x Vergrößerung;  
Quelle: eigene Bilder

Im Bild A der Abbildung 26 ist eine Übersichtsaufnahme einer tiefen Epithelfurche mit 500x Vergrößerung dargestellt. Der Rand der Furche, sowie die restliche Oberfläche des respiratorischen Epithels ist flächendeckend mit multiziliären Zellen bedeckt. Vereinzelt zeigen sich sekretorische Zellen.

In dem Bild B der Abbildung 26 ist der im Bild A markierte Ausschnitt mit 2000x Vergrößerung abgebildet. Es zeigt sich eindrücklich, dass ab dem Rand der Epithelfurche die Anzahl der multiziliären Zellen drastisch abnimmt. Am Grund der Epithelfurche sind die Zellgrenzen leicht erhaben, jedoch zeigen sich keine multiziliären Zellen.

---

### 3.2.2. Flache Furchen des embryonalen respiratorischen Epithels der Trachea

---

Die Bereiche mit den mitteltiefen Furchen zeigen ebenfalls eine verringerte Anzahl an multiziliären Zellen. Die Reduktion ist jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie bei den tiefen Epithelfurchen. Innerhalb der mitteltiefen Furchen befinden sich hauptsächlich glatte Zellen mit Mikrovilli ohne Zilien. Daneben befinden sich am Furchengrund kleine Cluster aus multiziliären Zellen. In der Übersichtsaufnahme im Bild A der Abbildung 27 ist die Diskrepanz zwischen dem Zilienbesatz an der glatten Epitheloberfläche und dem Grund der Epithelfurche ersichtlich. Das Bild B der Abbildung 27 ist eine vergrößerte Darstellung der Epithelfurche und zeigt sowohl die Anordnung von multiziliären Zellen in kleinen Clustern am Grund der Furche und die in der Nachbarschaft befindlichen Zellen, welche keine Zilien tragen, aber mit einem Mikrovilli Besatz ausgestattet sind.

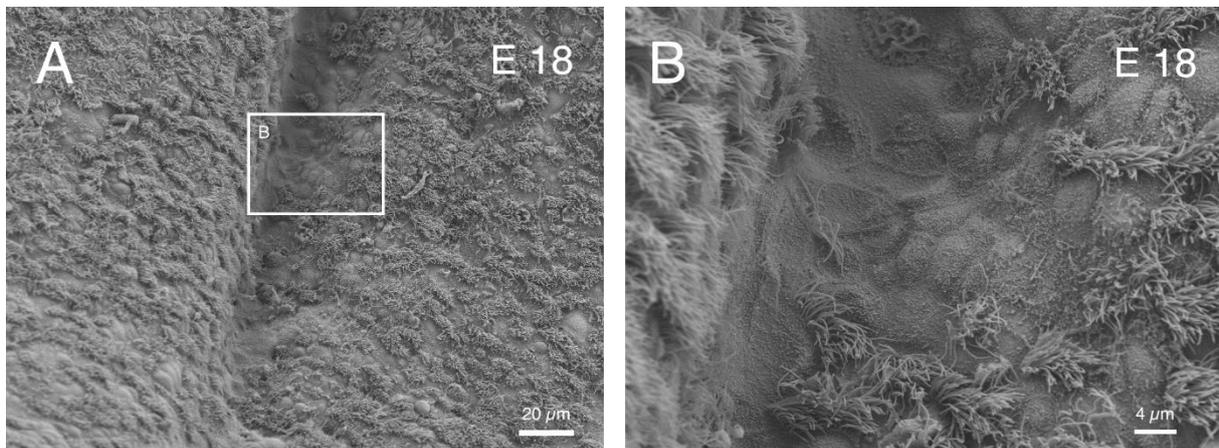


Abbildung 27: REM Untersuchung der Trachea flache Epithelfurchen E18 ; Bild A: senkrecht im Bild verlaufenden Furche mit reduzierter Ausprägung multiziliärer Zellen; Bild B: Vergrößerung 2000 x aus Bild A, kleine Cluster aus multiziliären Zellen und Bereiche mit flachen Zellen mit Mikrovilli ohne Zilien; Quelle: eigene Bilder

## 4. Diskussion

---

Im ersten Abschnitt der Diskussion werden die verwendeten Materialien und Untersuchungsmethoden kritisch bewertet. In den nachfolgenden Abschnitten der Diskussion werden die eigenen Ergebnisse mit den bereits vorhandenen Ergebnissen der Literatur, sowie den Ergebnissen aus der institutsinternen Forschungsgruppe, bezüglich der Entwicklung des embryonalen respiratorischen Epithels in der Nasenhöhle verglichen.

### 4.1. Material und Methoden

---

In der Literatur wurde die Entwicklung des respiratorischen Epithels anhand verschiedener Modellorganismen untersucht. Zu den verwendeten Versuchstieren zählen: das Haushuhn, mit den Tieren White Leghorn und Rode Island Red (Walsh und McLelland 1978), sowie der Rhesusaffe (Plopper et al. 1989), die Ratte (Souma 1987), die Maus (Jain et al. 2010, (Toskala et al. 2005) und das Kaninchen (Loots und Nel 1989), welche zu den Säugetieren zählen. In unserem Institut wurden mit dem Modellorganismus des White Leghorn (Haushuhn) bereits die embryonale Entwicklung der Lunge (Greulich 2019) und die embryonale Entwicklung der Luftsäcke (Hempel 2017) erforscht. Das Haushuhn hat sich als ein verlässlicher Modellorganismus erwiesen. Im Gegensatz zu den Säugetieren ist bei den Vögeln die Untersuchung der Embryonen im Hühnerei möglich. Dies hat entscheidende Vorteile. Die Bebrütung erfolgt unter kontrollierten Bedingungen in einem Inkubator. Bei den Säugetieren ist die Entnahme der Embryonen aus den Muttertieren notwendig. Durch die Verwendung des Inkubators ist es möglich alle Eier einer Serie zeitgleich mit deren Entwicklung zu beginnen und zu definierten Zeitpunkten, zum Beispiel alle 12 oder 24 Stunden, aus dem Inkubator zu entnehmen. Die Dauer der Bebrütung definiert dabei das embryonale Entwicklungsalter des Embryos. Als zweite Methode der Altersbestimmung der Embryonen erfolgte die Ausmessung der Zehenlänge. In der Arbeit von Hamburger und Hamilton ist die Zehenlänge mit dem embryonalen Entwicklungsalter korreliert worden, um das genaue Alter zu verifizieren. Diese Methode wird seit Jahrzehnten international verwendet. Ein weiterer Vorteil des Modellorganismus des Haushuhns ist, dass eine Korrelation der Entwicklung der Hühnerembryonen und der menschlichen Embryonen existiert (Bjørnstad et al. 2015). Auf Basis dieser Grundlagen ist eine grobe Korrelation, der am Tiermodell Haushuhn gefundenen Ergebnisse, mit der embryonalen Entwicklung des Menschen möglich.

Die Zielstrukturen im respiratorischen Epithel der embryonalen Trachea liegen an der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie (Michler 2019). Daher erfolgte die Untersuchung der multiziliären Zellen mit den elektronenmikroskopischen Verfahren REM und TEM. In der

Literatur ist das REM im Bereich der Zilienforschung unterrepräsentiert (El Zein et al. 2003; Fliegau und Omran 2006; Omran 2012; Omran et al. 2000). Viele Arbeiten sind bisher nur mit dem TEM erfolgt. Bereits im Jahre 1978 sind Untersuchungen des respiratorischen Epithels der Trachea mit dem Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt worden (Walsh und McLelland 1978).

Da das REM die Oberfläche der Probe untersucht, musste die Trachea, welche ein Rohr ist, im Rahmen der Vorbereitung in einzelne Stücke unterteilt werden. Eine Halbierung der Trachea geht mit einer zu starken Krümmung der Proben einher, was dazu führt, dass große Bereiche der Oberfläche mit dem REM nicht sicher beurteilt werden können. Nach mehreren Versuchsreihen stellte sich heraus, dass eine Präparation in drei Stücke optimal ist. Bei dieser Anzahl ist auf der einen Seite der Grad der Krümmung minimiert, bei gleichzeitig noch großer Fläche der einzelnen Probenstücke. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine artefaktarme Untersuchung möglichst großer Bereiche des respiratorischen Epithels der Trachea mit dem REM.

In der Arbeitsgruppe von Toskala wurde im Jahr 2005 an dem Modellorganismus der Swiss Webster Maus das respiratorische Epithel im Bereich der Trachea und den Bronchien mit der Laserkonfokalmikroskopie untersucht. Anstatt die Trachea in drei Stücke zu zerschneiden, wurde in dieser Arbeit die Trachea der Länge nach in zwei Hälften unterteilt. Dies hat den Vorteil, dass mit der Laserkonfokalmikroskopie eine größere Probenfläche untersucht werden kann. Allerdings ist jene Vorgehensweise für die Untersuchung im REM nicht geeignet. Eine derartige Probe wird durch die Kritische Punkt Trocknung so stark gekrümmt, dass die seitlichen Enden einfallen und der Elektronenstrahl des REMs die innere Oberfläche nicht mehr abtasten kann.

Die TEM Untersuchung ist die ideale Ergänzung zur REM Untersuchung. Mit dem TEM können die einzelnen Zeitpunkte der intrazellulären Ziliogenese dargestellt werden. Es betrifft insbesondere die Zentriolen, welche im Laufe der Entwicklung in Richtung der Zelloberfläche migrieren und sich unter der Zelloberfläche zu Basalkörpern umwandeln. Beide Strukturen können mit dem REM nicht dargestellt werden. Bei den multiziliären Zellen ist die TEM Untersuchung eine gute Methode, weil sie überlagerungsfrei die Zelloberfläche abbildet und auch eine sichere Unterscheidung zwischen Zilien und Mikrovilli ermöglicht. Die TEM Untersuchung ist seit Jahrzehnten verfügbar und eine etablierte Methode in der Zilienforschung (Walsh und McLelland 1978).

Als Nachteil der TEM Untersuchung gilt, dass die Probenstücke im Gegensatz zu den REM Proben deutlich kleiner sind, da zunächst 5 Proben aus dem gleichen Abschnitt der Trachea erstellt werden. Im Anschluss werden diese Proben methodenbedingt noch zusätzlich kleiner getrimmt. Damit ist die Zuordnung dieser kleinen Probenstücke zu der ursprünglichen

Lokalisation innerhalb der Trachea sehr schwierig. Die TEM Untersuchung verwendet Ultradünnschnitte mit einer Dicke von circa 50 nm. Der Durchmesser der Zilien ist damit größer, als der Ultradünnschnitt dick ist. Das bedeutet, dass im TEM immer nur Anschnitte eines Ziliums möglich sind. Da die meisten Zilien gebogen verlaufen, sind in dem Ultradünnschnitt meistens nur Teile der einzelnen Zilien erfasst.

Als ergänzendes Verfahren wurden die Proben mit der IF untersucht. Für die IF wird nur ein Fluoreszenzmikroskop benötigt. Es sind keine besonderen baulichen Voraussetzungen, wie zum Beispiel Vakuumpumpen und eine strukturelle Verstärkung der Böden, wie für die Elektronenmikroskopie, notwendig. Elektronenmikroskopische Zentren sind in Deutschland meistens nur an universitären Standorten etabliert.

Zur Untersuchung des respiratorischen Epithels für den Modellorganismus des Haushuhns wurde institutsintern nach Auswertung mehrerer Verdünnungsreihen eine Konzentration von 1:1000 für den primären Antikörper anti ac-Tub ermittelt, um die besten Ergebnisse zur Markierung der Zilien zu erzielen. In der Arbeit von Kohli et al. aus dem Jahr 2017 wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie anhand von Zellkulturen mit Hilfe verschiedener Antikörper die Proteinstrukturen innerhalb der Zilienmembran untersucht. Für den anti ac-Tub Antikörper wurde ebenfalls mit einer Konzentration von 1:1000 gearbeitet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die elektronenmikroskopischen Verfahren REM und TEM und die Immunofluoreszenz gegenseitig gut ergänzen, um die in dieser Dissertation gestellten Fragen zu beantworten. Die Ergebnisse dieser Dissertation beruhen auf einer punktuellen Untersuchung von verschiedenen Embryonen in fortlaufenden Entwicklungsstadien von E14 bis E18. Es war methodenbedingt keine funktionelle Analyse der einzelnen Zellen eines lebenden Organismus im zeitlichen Verlauf mit den verwendeten Verfahren möglich.

## **4.2. Zeitlicher Entwicklungsverlauf der Zilien**

---

Im zweiten Abschnitt der Diskussion werden die eigenen Ergebnisse mit den bereits vorhandenen Ergebnissen der Literatur, sowie den Ergebnissen aus der institutsinternen Forschungsgruppe, bezüglich der Entwicklung des embryonalen respiratorischen Epithels in der Nasenhöhle verglichen.

Im folgenden Abschnitt wird die Entwicklung der monoziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel der embryonalen Trachea beschrieben. Unsere Ergebnisse der REM Untersuchung zeigen, dass im Stadium E14 die monoziliären Zellen in der Mehrzahl auf der Epitheloberfläche nachweisbar sind. Sie waren circa 1 bis 4  $\mu\text{m}$  lang, hatten eine flache Zellgrenze und

zeichneten sich durch einen geringen Besatz mit Mikrovilli aus. Zusätzlich existieren rarefiziert monoziliäre Zellen, welche sich durch ein langes Monozilium, von bis zu 6  $\mu\text{m}$ , eine deutlich erhabene Zellbegrenzung und einen hohen Besatz mit Mikrovilli hervorheben. Jedoch erlaubt die REM Untersuchung keine Analyse der Ultrastruktur der monoziliären Zellen. Von multiziliären Zellen ist bekannt, dass sie Kinozilien besitzen, die monoziliären Zellen jedoch nicht (Brooks und Wallingford 2014; Knowles et al. 2013). Das REM kann methodenbedingt den Zilienschlag nicht untersuchen, welcher der Nachweis für Kinozilien wäre.

Für Primärzilien ist bekannt, dass sie eine 9+0 Struktur als inneren Aufbau besitzen, jedoch haben neuere Ergebnisse gezeigt, dass diese Struktur des Axonems im Verlauf auch variabel angeordnet sein kann (Sun et al. 2019).

Die Spitze eines motilen Ziliums wird als *Ciliary tip* bezeichnet. Auf dem Zentralpaar befindet sich eine Kappe auch bezeichnet als *Ciliary cap*. Ausgehend davon treten durch die Zilienmembran Fasern hindurch und bilden die *Ciliary crown*. Es ist bekannt, dass nicht alle Kinozilien diese *Ciliary crown* besitzen (Fisch und Dupuis-Williams 2011). In unseren REM Untersuchungen ist durch das Besputtern der Probe mit einer dünnen Goldschicht die Zilienspitze bezüglich des Vorhandenseins dieser *Ciliary crown* nicht sicher zu beurteilen. Selbst bei Vergrößerungen bis zu 8000x ist kein Unterschied zwischen der E18 Kinozilien- spitze und der E14 Spitze eines Ziliums zu erkennen.

In der Literatur existiert keine eindeutige Klassifikation für die Definition von monoziliären Zellen. Sie werden zum Beispiel als Primärzilien bezeichnet (Jain et al. 2010). Darüber hinaus werden außerdem kurze Zilien beschrieben, welche sich in embryonalen Organismen auf den Zelloberflächen von verschiedenen Geweben befinden. Dazu zählen neben dem respiratorischen Epithel auch die Oberfläche von glatten Muskelzellen, oder die Oberfläche von Fibroblasten (Sorokin 1968).

Die eigenen REM Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in Hinblick auf die Länge der Zilien zwei Gruppen von monoziliären Zellen auf dem embryonalen respiratorischen Epithel gibt. Die eine Gruppe zeichnet sich durch kurze Monozilien mit einer Länge von bis zu 4  $\mu\text{m}$  aus. Diese Zilien befinden sich bereits in dem frühen Entwicklungsstadium E14 auf einer Vielzahl von Epithelzellen. Ob es sich dabei um Progenitorzellen handelt, kann nicht abschließend beurteilt werden. Zu diesem Sachverhalt sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Die zweite Gruppe von Monozilien mit einer Länge von bis zu 6  $\mu\text{m}$  ist hauptsächlich nach E14 auf dem embryonalen respiratorischen Epithel mit der REM Untersuchung nachweisbar. Diese Zellen unterscheiden sich verglichen mit den kurzen monoziliären Zellen in der REM Untersuchung zusätzlich durch eine erhabene Zellgrenze und eine erhöhte Anzahl von Mikrovilli an der Zelloberfläche.

Mit der TEM Untersuchung war es uns möglich ein kurzes Monozilium im Stadium E14 und ein langes Monozilium im Stadium E16 darzustellen. Aufgrund der geringen Schnittdicke und

der Biegung des Monoziliums war eine Darstellung der gesamten Struktur jedoch nicht möglich. Somit kann auch keine genaue Aussage zur Binnenstruktur dieser Monozilien getroffen werden. Sie besitzen jedoch, wie auch die Zilien einer multiziliären Zelle, einen Basalkörper. Um die gesamte Binnenstruktur des Monozilium in der kompletten Länge, inklusive der Zilienspitze zu erfassen, wäre es technisch notwendig, Schnittbildserien einer gesamten Zelle herzustellen. Dieser Prozess wird *Array Tomographie* genannt (Micheva und Smith 2007). Diese technischen Möglichkeiten standen uns zum Zeitpunkt dieser Dissertation institutsintern nicht zur Verfügung. Es sind zukünftige Untersuchungen mit TEM Schnittserien, sowie zusätzlich Analysen der Genexpressionsmuster, wie zum Beispiel Foxj1, dieser monoziliären Zellen notwendig, um die Binnenstruktur und den Entwicklungszyklus dieser Zellen weiter zu erforschen.

Im Tiermodell der Maus (C57BL/6J mice) und an Zellkulturen konnten Monozilien am Entwicklungstag 12,5 mit der IF (acteyliertes Alpha Tubulin) nachgewiesen werden, welche bis zum Entwicklungstag 14,5 bestehen. Zusätzlich zu der IF wurden in dieser Arbeit die Methoden REM und TEM verwendet (Jain et al. 2010). Zur Korrelation mit unseren Ergebnissen, welche auf dem Modellorganismus des Haushuhns basieren, muss bedacht werden, dass die Gestationsdauer bei dem verwendeten Modellorganismus der Maus, je nach dem Alter des Muttertieres, zwischen 18,6 bis 20,8 Tagen variiert (Holinka et al. 1978). Somit ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse zwischen dem Haushuhn (White Leghorn) und der Maus (C57BL/6J mice) nur eingeschränkt möglich, weil innerhalb von 12 bis 24 Stunden gravierende Änderungen in der Ausprägung von Zilien auftreten.

Mit der Untersuchungsmethode IF konnten wir für das Alter E14, im Gegensatz zur Arbeit von Jain et al., die Monozilien nicht sicher detektieren. Ein möglicher Grund kann dafür sein, dass der Antikörper nicht spezifisch genug ist, um auf dem embryonalen Gewebe diese Zielstruktur darzustellen. Ein weiterer Faktor ist, dass unsere Verdünnungsreihen für die Darstellung von multiziliären Zellen optimiert worden sind. Ein Problemfaktor in der IF ist das Hintergrundsignal (Background), welches einer unspezifischen Bindung des Antikörpers entspricht. Um den Background gering zu halten, wurde mit Verdünnungen von bis zu 1:1000 gearbeitet. Bei dieser Verdünnung zeigten sich an der Oberfläche einzelne punktförmige Signale. Eine eindeutige Zuordnung, ob es sich um Artefakte oder um ein Monozilium handelt war nicht mit Sicherheit feststellbar. In einer weiteren institutseigenen Arbeit, bei dem Versuch zur Darstellung von monoziliären Zellen des respiratorischen Epithels in den Nasenhöhlen, zeigte sich in Verdünnungsreihen von bis zu 1:10.000 dasselbe Phänomen (Reinke et al. 2021).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Methode REM insgesamt gut geeignet ist, um in der Fläche die einzelnen monoziliären Zellen zu erfassen. Jedoch erlaubt die REM Untersuchung keine Aussage bezüglich der Ultrastruktur dieser Monozilien. Im Gegensatz

dazu kann die TEM Untersuchung zwar die Ultrastruktur darstellen, ist jedoch ungeeignet die Anzahl der Monozilien auf einer Fläche zu erfassen. Neben den in der Literatur beschriebenen kurzen Zilien von bis zu 4  $\mu\text{m}$  Länge, gibt es Hinweise darauf, dass im Bereich der Trachea in den späteren Entwicklungsstadien längere Monozilien von bis zu 6  $\mu\text{m}$  Länge existieren. Diese Zellen, mit den längeren Monozilien, sind durch eine deutlich höhere Anzahl von Mikrovilli und eine erhabene Zellbegrenzung gekennzeichnet.

Im folgenden Abschnitt wird die Entwicklung der multiziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel der embryonalen Trachea diskutiert. Erkenntnisse, über die zeitliche Entwicklung von multiziliären Zellen im Bereich des respiratorischen Epithels der Trachea, sind in der Literatur unterrepräsentiert. Eine multiziliäre Zelle ist dadurch gekennzeichnet, dass in den Anfangsstadien die Länge der einzelnen Zilien an ihrer Oberfläche sehr unterschiedlich ist und erst in den späteren Entwicklungsstadien die endgültige Zilienlänge von circa 6  $\mu\text{m}$  erreicht wird. Nach Abschluss der Entwicklung zeigt sich eine einheitliche Zilienlänge. In der Literatur wird bei multiziliären Zellen die Zilienlänge ebenfalls mit 6  $\mu\text{m}$  angegeben (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

Die Entwicklung der multiziliären Zellen auf dem embryonalen respiratorischen Epithel der Trachea beginnt sporadisch verteilt über die Oberfläche. Um diese ersten multiziliären Zellen bilden sich in der Nachbarschaft weitere multiziliäre Zellen, sodass im weiteren Entwicklungsverlauf Cluster aus multiziliären Zellen entstehen. Am Anfang enthalten diese Cluster nur wenige multiziliäre Zellen, welche sich teils streifenförmig, teils sternförmig auf der Epitheloberfläche ausdehnen. Diese Cluster breiten sich am Rand aus. Im Zentrum dieser Cluster sind, die am weitesten entwickelten multiziliären Zellen bezüglich der Anzahl und Länge der Zilien lokalisiert. Zunächst befinden sich nur viele kleine multiziliäre Cluster auf der Zelloberfläche, welche in den nachfolgenden 2 Entwicklungstagen immer größer werden und zunehmend miteinander verschmelzen. Ab dem Entwicklungsalter E18 sind alle Cluster miteinander verschmolzen und führen zu einem flächendeckenden Besatz mit multiziliären Zellen. In der Forschungsarbeit von Neugebauer et al. sind, die im Rahmen von Operationen im Bereich der Nasenchirurgie entnommenen Proben der Schleimhaut, in Zellkulturen aufbereitet worden. Anschließend wurde die Ziliogenese dieser Proben mit dem REM untersucht. Die REM Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Epithelzellen mit einer glatten Oberfläche und Epithelzellen, welche bedeckt sind mit Zilien und Mikrovilli. Diese existieren nebeneinander und formen ein irreguläres Muster (Neugebauer et al. 2003). Obwohl diese Daten mit Zellkulturen gewonnen wurden, besteht die Möglichkeit, dass es sich um dieselbe Clusterbildung bei der Entwicklung der Zilien handelt, welche wir in den Hühnerembryonen im Bereich des respiratorischen Epithels der Trachea, in den verschiedenen Entwicklungsstadien beobachten konnten.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die eigenen Ergebnisse der zeitlichen Entwicklung von multiziliären Zellen am Modellorganismus des Haushuhns mit anderen Modellorganismen und mit den institutsinternen Ergebnissen, bezüglich der Entwicklung des respiratorischen Epithels in der Nasenhöhle, verglichen.

Am Entwicklungstag E14,5 sind die ersten multiziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel der Trachea des Huhns mit der Methode REM nachweisbar. In der Arbeit von Jain et al. sind am Entwicklungstag 15,5 am Modellorganismus der Maus erste multiziliäre Zellen mit Hilfe von Beta Tubulin in der IF nachgewiesen worden (Jain et al. 2010). Jedoch gilt zu beachten, dass die Gestationsdauer bei dem Modellorganismus der Maus bis zu zwei Tage variieren kann (Holinka et al. 1978).

Eine weitere Arbeit untersucht die Ziliogenese mit dem TEM an zwei Modellorganismen, dem Rhode Island Red und dem White Leghorn *domestic fowls* (*Gallus gallus var. domesticus*). In dieser Arbeit wird der zeitliche Verlauf der Entwicklung der Zilien in 3 Abschnitte gegliedert (Entwicklungsstage 10 bis 14, 15 bis 16 und 17 bis 21). In den Entwicklungstagen 10 bis 14 werden kurze Mikrovilli, jedoch keine mono- oder multiziliären Zellen beschrieben (Walsh und McLelland 1978). Ab den Entwicklungstagen 15 bis 16 wurden einige monoziliäre Zellen nachgewiesen. Der Beginn der Entwicklung multiziliärer Zellen wird ab dem Tag 17 beobachtet. In den Tagen 19 und 20 sind die multiziliären Zellen voll entwickelt (Walsh und McLelland 1978). Unsere TEM Untersuchung kann am Entwicklungstag E14 das erste kurze Monozilium und am Entwicklungstag E 15 die erste multiziliäre Zelle nachweisen. Ab dem Entwicklungstag E 16,5 gelingt uns mit der TEM Untersuchung zusätzlich die Darstellung der inneren 9+2 Struktur der Zilien. In der Arbeit von Walsh et al. sind zwei unterschiedliche Hühner verwendet worden. Unsere Ergebnisse basieren nur auf einem der beiden Tiere (White Leghorn). Es ist unklar, welchen Einfluss das andere Tier (Rhode Island Red) auf den zeitlichen Verlauf der Ergebnisse, bezüglich der Ziliogenese hat. Laut unserer REM Ergebnisse ist die Entwicklung der multiziliären Zellen am Entwicklungstag E18 weitestgehend komplettiert. In der Arbeit von Walsh et al. ist dies erst für den Tag 20 nachgewiesen worden. Dieser zeitliche Unterschied ist nicht allein durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (REM vs. TEM) zu erklären. Unsere TEM Untersuchung zeigt am Entwicklungstag E18 weiterentwickelte multiziliäre Zellen, verglichen mit dem Tag E18 aus der Arbeit von Walsh et al.

Das respiratorische Epithel befindet sich nicht nur in der Trachea, sondern zum Beispiel auch in Teilen der Nasenhöhlen. Es ist, anhand von Embryonen des New Zealand white Kaninchens, im Gestationsalter zwischen 18 und 23 Tagen, die Ziliogenese des respiratorischen Epithels der Nasenhöhlen, mit dem TEM erforscht worden. Dabei zeigt sich, dass die Ziliogenese ab dem 19. Tag der embryonalen Entwicklung beginnt. In den folgenden zwei Tagen tritt eine Beschleunigung der Ziliogenese auf (Loots und Nel 1989). Bei dem New Zealand white Kaninchen beträgt die Gestationsdauer 29 bis 35 Tage (Wang et al. 2010).

Damit ist ein direkter Vergleich mit dem Modellorganismus White Leghorn nicht möglich, da bereits innerhalb von 24 Stunden große Veränderungen bezüglich der Ziliogenese zu beobachten sind. In unserer anderen institutsinternen Arbeit erfolgt die Untersuchung des respiratorischen Epithels im Bereich der Nasenhöhle an zwei unterschiedlichen Lokalisationen. An der Concha nasalis media sind im Stadium E14,5 die ersten multiziliären Zellen nachweisbar. Ab dem Entwicklungstag E18 ist ein geschlossener Zellverband mit multiziliären Zellen vorhanden. Auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum sind bereits ab dem Entwicklungstag E14 erste multiziliäre Zellen vorhanden. Ab dem Entwicklungstag E16 ist die Entwicklung in Hinblick auf den Besatz mit multiziliären Zellen abgeschlossen und zeigt einen flächendeckenden Besatz. In Hinblick auf den Beginn des ersten Auftretens von multiziliären Zellen bestehen somit keine gravierenden Unterschiede zu unseren Ergebnissen aus dem Bereich der Trachea. Jedoch ist die Entwicklung auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum circa 2 Tage früher abgeschlossen als in der Trachea (Reinke et al. 2021).

Im Modellorganismus der Swiss Webster Maus ist die Untersuchung der Ziliogenese im Bereich der Trachea, der Lobärbronchien und den Bronchiolen erfolgt. Die Untersuchung ist mit dem REM durchgeführt worden. Auf dem respiratorischen Epithel der Trachea und der Lobärbronchien sind die ersten Zilien am Entwicklungstag E16 der embryonalen Entwicklung beobachtet worden. Dies sind kurze Zilien auf einzelnen Zellen, welche umgeben sind von undifferenzierten Zellen ohne Mikrovilli. Im Bereich der Bronchiolen sind die ersten Zellen mit Zilien 2 Tage später, also am 18. Tag der embryonalen Entwicklung nachgewiesen worden. Diese besitzen Monozilien mit umgebenden Mikrovilli. Am 18. Tag nimmt die Anzahl und Länge der Zilien in der Trachea und der Lobärbronchien zu. Auch nach der Geburt steigt die Anzahl der multiziliären Zellen in der Trachea weiter und nähert sich am 21. postnatalen Tag der Anzahl in einer ausgewachsenen Maus an (Toskala et al. 2005). Dabei ist zu beachten, dass das Gestationsalter der Swiss Webster Maus 19 bis 20 Tage beträgt (Biosciences 2020). Ein Problem bei der Altersbestimmung der Embryonen der oben genannten Tiere (Swiss Webster Maus, C57BL/6J Maus und New Zealand white Kaninchen) stellt die schwankende Gestationsdauer dar. Diese kann wie bereits beschrieben um ein bis drei Tage schwanken. Da bei der vorgeburtlichen Entnahme der Embryonen die Gestationsdauer nicht exakt bekannt ist, stellt sich die Frage, ob eine längere Gestationsdauer Einfluss auf die zeitlichen Abläufe während der embryonalen Entwicklung hat. Wenn dies so ist, dann sind die Ergebnisse nicht direkt mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Diese Problematik besteht nicht bei dem Modellorganismus des Haushuhns (White Leghorn).

Es existiert seit dem Jahre 2010 ein Modell, welches die Transformation einer Zelle mit einem Primärzilium (Monozilium) in eine multiziliäre Zelle beschreibt. Aus der Arbeit von Jain et al. geht hervor, dass es eine Zwischenphase gibt, in welcher die Zellen bereits das Monozilium verloren haben, aber noch keine neuen multiplen Zilien an der Oberfläche vorhanden sind. Wir sehen auch Hinweise dafür in unseren eigenen Daten. In der REM Untersuchung haben diese Zellen eine glatte Oberfläche ohne Zilien und existieren in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer multiziliären Zelle. In der TEM Untersuchung konnten wir zeigen, dass unter der Zelloberfläche dieser Zellen jedoch zahlreiche Zentriolen vorhanden sind. Wie es aus den Phasen der Ziliogenese bekannt ist, werden diese Zentriolen zur Zelloberfläche migrieren und sich zu einem Basalkörper umwandeln. Da es jedoch verschiedene Zellen in der REM und TEM Untersuchung sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob sich diese Zellen tatsächlich zu multiziliären Zellen entwickelt hätten. Da die Zilien an der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie liegen, kann auch die Verwendung von Zellkulturen dieses diagnostische Problem nur begrenzt lösen.

### **4.3. Besonderheit der Verteilung multiziliärer Zellen**

---

Im folgenden Abschnitt werden die Besonderheiten der Verteilung von monoziliären und multiziliären Zellen im Bereich von den Furchen des embryonalen respiratorischen Epithels diskutiert. Im Rahmen der Auswertung der REM und der IF Ergebnisse, vor allem in den höheren Entwicklungsstadien (E17 und E18), zeigt sich eine Besonderheit bezüglich der Ausprägung von multiziliären Zellen. In Abhängigkeit von dem Auftreten und der Tiefe von horizontalen Furchen im respiratorischen Epithel tritt eine verminderte Ausprägung des multiziliären Wachstums auf. Dabei handelt es sich nicht um durch die Präparation verursachte Artefakte. Dies ist durch REM Vergrößerungen bis 20.000x untersucht und bestätigt worden. Je tiefer eine Furche ist, desto weniger multiziliäre Zellen sind am Furchengrund entwickelt. Dieses Phänomen ist in den Stadien E17 und E18 gut zu beobachten, aufgrund der hohen Anzahl der im restlichen Epithel vorhandenen multiziliären Zellen. Eine Ursache für die deutliche Reduktion von multiziliären Zellen am Grund der Furchen kann mit den drei verwendeten Untersuchungsmethoden nicht festgestellt werden. Bereits in den frühen embryonalen Stadien (E14 bis E15,5), zeigen sich vereinzelt flache Epithelfurchen. Am Grund dieser flachen Epithelfurchen scheint auch die Anzahl der monoziliären Zellen vermindert zu sein. In der Arbeit von Jain et al. ist dargestellt worden, dass Zellen, welche ein Monozilium ausbilden, im Verlauf der weiteren Differenzierung zu multiziliären Zellen werden. Dabei spielt das *Foxj1* Gen eine entscheidende Rolle (Jain et al. 2010). Ob eine Korrelation zwischen der geringeren Anzahl von Monozilien in den Furchen der frühen Stadien und der später

verminderten Anzahl von multiziliären Zellen besteht, ist unklar. Auch, ob ein möglicher Einfluss auf die Ziliogenese des respiratorischen Epithels, durch den in der Nähe befindlichen Knorpel besteht, sollten weitere Untersuchungen klären. Es ist bekannt, dass der Knorpel pränatal und postnatal multiple Funktionen erfüllt. Der Knorpel stützt die Struktur des frühen Embryos, formt Vorlagen für das Wachstum der Knochen und ist in der postnatalen Zeit ein wichtiger Bestandteil für die Entwicklung und die Reparatur der Knochen. Es wird vermutet, dass Ghrelin aus den Knorpelzellen sezerniert wird. Ghrelin ist ein endogener Ligand, der an der Freisetzung von Wachstumshormonen beteiligt ist (Caminos et al. 2005).

### **4.4. Entwicklungsgradienten in der Trachea**

---

REM Untersuchungen der multiziliären Zellen des respiratorischen Epithels der Trachea am Modellorganismus der Ratte haben gezeigt, dass im distalen Verlauf die Länge und der Durchmesser der Zilien abnehmen (Souma 1987). Histologische Untersuchungen des tracheobronchialen Epithels an erwachsenen Rhesusaffen haben ergeben, dass das Epithel, verglichen mit dem Übergang zu den terminalen Bronchiolen, im kranialen Teil der Trachea größer ist (Plopper et al. 1989). Im Modellorganismus der Maus hat sich gezeigt, dass es einen zeitlichen kraniokaudalen Entwicklungsgradienten bezüglich der Ausprägung von multiziliären Zellen gibt (Toskala et al. 2005).

Aufgrund der in der Literatur vorhandenen Ergebnisse, bezüglich eines kraniokaudalen Entwicklungsgradienten der multiziliärer Zellen in der embryonalen Trachea, ist in dieser Dissertation die Hypothese untersucht worden, ob auch am Modellorganismus des White Leghorn ein kraniokaudaler Entwicklungsgradient innerhalb der Trachea besteht. Es stellte sich heraus, dass sowohl an den kranialen als auch den kaudalen Lokalisationen ein starker lokaler Gradient bezüglich des zeitlichen Auftretens und der Entwicklung von multiziliären Zellen besteht. Dieser Gradient ist besonders in den frühen Entwicklungsstadien deutlich ausgeprägt und resultiert im Laufe der Entwicklung in der multiziliären Clusterbildung, welche im Abschnitt 4.2 bereits ausführlich diskutiert worden ist. Die Konsequenz dieser starken lokalen Divergenz ist, dass das Vorhandensein des vermuteten kraniokaudalen Gradienten innerhalb der Trachea überlagert wird. Dies hat zur Folge, dass der in den anderen Modellorganismen nachgewiesene kraniokaudale Gradient in unseren Proben nicht zu detektieren ist. Hinweise für die multiziliäre Clusterbildung finden sich auch in menschlichen Zellkulturen (Neugebauer et al. 2003). Der kraniokaudale Gradient wurde in Säugetieren detektiert. Ob dieser Gradient in dem Modellorganismus des Haushuhns (Vogel) nur überlagert ist oder tatsächlich nicht existiert, müssen weitere Untersuchungen klären.

Im folgenden Abschnitt wird im Detail erläutert, welche spezifischen technischen und probenbedingten Herausforderungen existieren, um einen kraniokaudalen Entwicklungsgradienten in der embryonalen Trachea zu untersuchen. Es hat sich gezeigt, dass Probenstücke mit einer Ausdehnung von circa 200  $\mu\text{m}$  x 1000  $\mu\text{m}$  in der Kritischen Punkt Trocknung geringe trockenungsbedingte Biegungsartefakte aufweisen. Diese winzigen Proben bilden jedoch nur einen kleinen Ausschnitt der gesamten Trachea ab. Aufgrund der physiologischen Biegung der Trachea, sind die Randbereiche der Probe teilweise für das REM nicht beurteilbar, wodurch sich die zu untersuchende Fläche weiter verkleinert. Bei dem Versuch größere Stücke zu verwenden, tritt das Problem auf, dass sich die Krümmung nach der Kritischen Punkt Trocknung zusätzlich verstärkt, was genau den gegenteiligen Effekt erzielt und die zu untersuchende Fläche des respiratorischen Epithels im REM deutlich reduziert. Um zukünftig einen größeren Abschnitt der Trachea gleichzeitig zu untersuchen, sollte die Präparationstechnik in weiterführenden Arbeiten optimiert werden.

Im Rahmen der Datenauswertung sind verschiedene Ansätze untersucht worden, um eine quantitative Auszählung der Zilien auf der gesamten Probenoberfläche des respiratorischen Epithels der Trachea zu ermöglichen. Von den drei verwendeten Untersuchungsmethoden bietet die REM Untersuchung dahingehend das größte Potenzial. Der starke lokale Entwicklungsgradient, mit der ausgeprägten multiziliären Clusterbildung auf der Probenoberfläche hat gezeigt, dass eine quantitative Auszählung der multiziliären Zellen über die gesamte Oberfläche nicht zielführend ist. Stattdessen sollte auch in weiterführenden Untersuchungen der Fokus auf der spezifischen Entwicklung der einzelnen Cluster liegen.

Auch eine sichere Längenbestimmung aller individuellen Zilien, ist technisch mit vielen Schwierigkeiten verbunden. Die Methode der IF hat nicht die nötige Vergrößerung, um einzelne Zilien sicher auszumessen. Die TEM Untersuchung hat die Limitation der Dünnschnitte, wodurch selten ein Zilium in der gesamten Länge erfasst ist. Die Schwierigkeit der REM Untersuchung einer gebogenen Oberfläche besteht darin, dass die wahre Größe des Ziliums aufgrund der variierenden Betrachtungswinkel häufig falsch eingeschätzt wird. Dennoch bietet die REM Untersuchung verglichen mit dem TEM und der IF die beste Möglichkeit die Länge einzelner Zilien auszumessen. Um die Länge der Zilien korrekt zu bestimmen ist es leichter, wenn sie an den Bruchkanten von den Proben untersucht werden. Außer unter diesen optimalen Bedingungen, in denen das Zilium im rechten Winkel zur Bildachse steht, ist die Messung der Zilienlänge nicht sicher reproduzierbar. In den meisten Fällen sind die Zilienlängen daher nicht objektiv miteinander vergleichbar gewesen. In Anbetracht dieser technischen Limitationen ist kein gravierender Unterschied bezüglich der Zilienlänge zwischen den kranialen und kaudalen multiziliären Zellen der Trachea zu erkennen. Zukünftige Arbeiten könnten mehr Bruchkanten untersuchen, um eine konkretere Längenmessung der einzelnen Zilien zu ermöglichen.

#### 4.5. Klinische Diagnostik und Ausblick

---

Das respiratorische Epithel der Trachea und der Nasenhöhle gilt als Modellgewebe für die Untersuchung von multiziliären Zellen, da es zum Beispiel im Rahmen einer Bronchoskopie leicht zugänglich ist. Die PCD ist eine Krankheit, welche von zusätzlichen Erkenntnissen und weiteren diagnostischen Untersuchungsverfahren profitieren kann. Im Rahmen der PCD Diagnostik werden bronchoskopisch gewonnene Proben aus der nasalen und bronchialen Schleimhaut bereits mit dem TEM und mit der IF untersucht (Nüßlein et al. 2013; Papon et al. 2010). Die TEM Untersuchung war der frühere Goldstandard der PCD Diagnostik. Im Rahmen unserer Literaturrecherche zur PCD Diagnostik zeigte sich, dass die REM Untersuchung im diagnostischen Algorithmus unterrepräsentiert ist. Der Vorteil der REM Untersuchung besteht darin, dass ein stufenloses Vergrößern der Oberfläche der Probe möglich ist. Dadurch kann die gesamte Oberfläche einer Biopsieprobe in kurzer Zeit analysiert und die gewünschte Region spezifisch mit hoher Vergrößerung dargestellt werden. Insbesondere zur Beurteilung des Zilienbesatzes der Biopsieprobe, zum Beispiel nach exogener Schädigung oder im Rahmen einer Erkrankung wie der PCD, ist die REM Methode besser geeignet als die IF oder die TEM. Eine praktische Anwendung der REM Untersuchung zur Verlaufsbeurteilung des respiratorischen Epithels, nach Schädigung durch eine Viruserkrankung, findet sich bereits in der Veterinärmedizin. Am Modellorganismus eines Huhns wurden die schädigenden Auswirkungen auf die Oberfläche des respiratorischen Epithels bei einer Infektion mit der *New Castle Krankheit* untersucht. In der Arbeit von Mast et al. sind dabei mit dem REM die Regenerationsvorgänge nach einer durchgemachten Infektion dokumentiert worden. Nach 15 Tagen konnte gezeigt werden, dass alle Schäden an den multiziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel wieder regeneriert waren (Mast et al. 2005). Auch an einem anderen Modellorganismus ist mit der Hilfe der REM Untersuchung der Reparaturmechanismus des respiratorischen Epithels im Bereich der Bronchien zu verschiedenen Zeitpunkten an *Knockout Mäusen* untersucht worden (Lawson et al. 2002). Diese Beispiele zeigen, dass die REM Untersuchung als diagnostisches Tool in der Medizin bereits sinnvoll angewandt wird.

Die genetischen Analysen der PCD Erkrankungen zeigen, dass eine klinische Symptomatik durch viele verschiedene genetische Defekte hervorgerufen werden kann. In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass eine Kombination der diagnostischen Verfahren für die PCD Diagnostik notwendig ist, um alle Fälle dieser Krankheit sicher diagnostizieren zu können (Leigh et al. 2013). Daher hat auch die IF in der PCD Diagnostik eine wichtige Funktion. In unserer Arbeit ist, mit einer Verdünnung von 1:1000 für den primären Antikörper anti ac-Tub und einer Verdünnung von 1:300 für den sekundären Antikörper, eine optimale Darstellung des Axonems der Zilien multiziliärer Zellen erreicht worden. Die Arbeitsgruppe um Kohli et al.

hat zur Erforschung der Zilien ebenfalls den primären Antikörper anti ac-Tub mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet (Kohli et al. 2017).

Im Rahmen unserer institutseigenen Untersuchungen mit der IF wurde die Verwendung von Quantendots exploriert. Verglichen mit unserem verwendeten organischen Fluoreszenzfarbstoff ist der Vorteil der Quantendots, dass sie eine deutlich stärkere Fluoreszenz besitzen. Außerdem sind Quantendots elektronendicht und können somit sowohl in der TEM als auch der REM Untersuchung detektiert werden. Das bedeutet, dass IF Proben, welche als Fluoreszenzmittel Quantendots verwenden, im Anschluss elektronenmikroskopisch untersucht werden können. Dadurch ist es möglich die diagnostischen Vorteile der drei Methoden miteinander zu kombinieren (Hermann et al.; Kaur et al. 2002). Erste Versuche bezüglich der Kombination der Verfahren REM, TEM und IF sind in unserer Forschungsgruppe bereits durchgeführt worden.

## 5. Literaturverzeichnis

---

Adams, N. A.; Awadein, Ahmed; Toma, Hassanain S. (2007): The retinal ciliopathies. In: *Ophthalmic genetics* 28 (3), S. 113–125. DOI: 10.1080/13816810701537424.

Avasthi, Prachee; Marshall, Wallace F. (2012): Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. In: *Differentiation; research in biological diversity* 83 (2), S30-42. DOI: 10.1016/j.diff.2011.11.015.

Badano, Jose L.; Mitsuma, Norimasa; Beales, Phil L.; Katsanis, Nicholas (2006): The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. In: *Annual review of genomics and human genetics* 7, S. 125–148. DOI: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115610.

Billmyre, Katherine Kretovich; Hutson, Mary; Klingensmith, John (2015): One shall become two: Separation of the esophagus and trachea from the common foregut tube. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 244 (3), S. 277–288. DOI: 10.1002/dvdy.24219.

Biosciences, Taconic (2020): What are Timed Pregnant Rodent Models? Online verfügbar unter <https://www.taconic.com/taconic-insights/quality/what-are-timed-pregnant-mice-rats.html#>, zuletzt aktualisiert am 21.06.2020, zuletzt geprüft am 21.06.2020.

Bjørnstad, Sigrid; Austdal, Lars Peter Engeset; Roald, Borghild; Glover, Joel Clinton; Paulsen, Ragnhild Elisabeth (2015): Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 355 (3), S. 386–396. DOI: 10.1124/jpet.115.227025.

Bjørnstad, Sigrid; Samara, Athina; Erichsen, Aage; Paulsen, Ragnhild E.; Glover, Joel C.; Roald, Borghild (2016): Hampered Lung Maturation in Methimazole-Induced Hypothyroidism in Fetal Chicken: Morphological and Molecular Correlates to Human Fetal Development. In: *NEO* 110 (2), S. 83–92. DOI: 10.1159/000444656.

Boon, Mieke; Wallmeier, Julia; Ma, Lina; Loges, Niki Tomas; Jaspers, Martine; Olbrich, Heike et al. (2014): MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. In: *Nat Commun* 5 (1), S. 4418. DOI: 10.1038/ncomms5418.

Breslow, David K.; Holland, Andrew J. (2019): Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis. In: *Annual review of biochemistry* 88, S. 691–724. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111153.

---

Brody, S. L.; Yan, X. H.; Wuerffel, M. K.; Song, S. K.; Shapiro, S. D. (2000): Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23 (1), S. 45–51. DOI: 10.1165/ajrcmb.23.1.4070.

Brooks, Eric R.; Wallingford, John B. (2014): Multiciliated cells. In: *Current biology : CB* 24 (19), R973-82. DOI: 10.1016/j.cub.2014.08.047.

Bustamante-Marin, Ximena M.; Ostrowski, Lawrence E. (2017): Cilia and Mucociliary Clearance. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (4). DOI: 10.1101/cshperspect.a028241.

Camino, J. E.; Gualillo, O.; Lago, F.; Otero, M.; Blanco, M.; Gallego, R. et al. (2005): The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. In: *Endocrinology* 146 (3), S. 1285–1292. DOI: 10.1210/en.2004-1379.

Castleman, Victoria H.; Romio, Leila; Chodhari, Rahul; Hirst, Robert A.; Castro, Sandra C. P. de; Parker, Keith A. et al. (2009): Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. In: *American journal of human genetics* 84 (2), S. 197–209. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.01.011.

Chen, Holly Y.; Kelley, Ryan A.; Li, Tiansen; Swaroop, Anand (2021): Primary cilia biogenesis and associated retinal ciliopathies. In: *Seminars in cell & developmental biology* 110, S. 70–88. DOI: 10.1016/j.semcd.2020.07.013.

Cherry, J. D.; Taylor-Robinson, D. (1970): Large-quantity production of chicken embryo tracheal organ cultures and use in virus and mycoplasma studies. In: *Applied microbiology* 19 (4), S. 658–662. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5463183/>.

Chodhari, R.; Mitchison, H. M.; Meeks, M. (2004): Cilia, primary ciliary dyskinesia and molecular genetics. In: *Paediatric respiratory reviews* 5 (1), S. 69–76. DOI: 10.1016/j.prrv.2003.09.005.

Dawe, Helen R.; Farr, Helen; Gull, Keith (2007): Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. In: *Journal of Cell Science* 120 (Pt 1), S. 7–15. DOI: 10.1242/jcs.03305.

Deist, Melissa S.; Gallardo, Rodrigo A.; Bunn, David A.; Kelly, Terra R.; Dekkers, Jack C. M.; Zhou, Huaijun; Lamont, Susan J. (2017): Novel Mechanisms Revealed in the Trachea Transcriptome of Resistant and Susceptible Chicken Lines following Infection with Newcastle Disease Virus. In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 24 (5). DOI: 10.1128/00027-17.

Dirksen, Ellen Roter (1991): Centriole and basal body formation during ciliogenesis revisited. In: *Biology of the Cell* 72 (1), S. 31–38. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/024849009190075X>.

El Zein, Loubna; Omran, Heymut; Bouvagnet, Patrice (2003): Lateralization defects and ciliary dyskinesia: lessons from algae. In: *Trends in Genetics* 19 (3), S. 162–167. DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00026-X.

Emmer, Brian T.; Maric, Danijela; Engman, David M. (2010): Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. In: *Journal of Cell Science* 123 (Pt 4), S. 529–536. DOI: 10.1242/jcs.062968.

Fisch, Cathy; Dupuis-Williams, Pascale (2011): Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! In: *Biology of the Cell* 103 (6), S. 249–270. DOI: 10.1042/BC20100139.

Fliegauf, Manfred; Omran, Heymut (2006): Novel tools to unravel molecular mechanisms in cilia-related disorders. In: *Trends in Genetics* 22 (5), S. 241–245. DOI: 10.1016/j.tig.2006.03.002.

Funk, Maja C.; Bera, Agata N.; Menchen, Tabea; Kualess, Georg; Thriene, Kerstin; Lienkamp, Soeren S. et al. (2015): Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. In: *The EMBO Journal* 34 (8), S. 1078–1089. DOI: 10.15252/emj.201490805.

Goetz, Sarah C.; Anderson, Kathryn V. (2010): The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (5), S. 331–344. DOI: 10.1038/nrg2774.

Greulich, Martha Anett (2019): Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen der Lungenentwicklung mit epithelialen und mesenchymalen Markern im embryonalen Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*).

Hagiwara, Haruo; Ohwada, Nobuo; Takata, Kuniaki (2004): Cell Biology of Normal and Abnormal Ciliogenesis in the Ciliated Epithelium. In: *International review of cytology* 234, S. 101–141. DOI: 10.1016/S0074-7696(04)34003-9.

Hamburger, V.; Hamilton, H. L. (1992): A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 195 (4), S. 231–272. DOI: 10.1002/aja.1001950404.

Hempel, E. (2017): Immunzytochemische Untersuchung der anterioren Luftsackentwicklung mit epithelialen und mesenchymalen Markern im embryonalen Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*). Dissertation. Universität Rostock. Elektronenmikroskopisches Zentrum Rostock.

Hermann, Rene; Walther, Paul; Müller, Martin: Immunogold labeling in scanning electron microscopy. In: *Histochemistry and Cell Biology* 1996 (106), S. 31–39.

Hiereth, Markus (1996): Antibiotika in der Tierhaltung: Ursachen und Wirkungen des Mißbrauchs. In: *Deutsches Ärzteblatt* (93), S. 51–52. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/4492/Antibiotika-in-der-Tierhaltung-Ursachen-und-Wirkungen-des-Missbrauchs>.

Higgins, Michael; Obaidi, Ismael; McMorrow, Tara (2019): Primary cilia and their role in cancer. In: *Oncology letters* 17 (3), S. 3041–3047. DOI: 10.3892/ol.2019.9942.

Hogg, D. A. (1982): Ossification of the laryngeal, tracheal and syringeal cartilages in the domestic fowl. In: *Journal of Anatomy* 134 (Pt 1), S. 57–71.

Holinka, C. F.; Tseng, Y. C.; Finch, C. E. (1978): Prolonged gestation, elevated preparturitional plasma progesterone and reproductive aging in C57BL/6J mice. In: *Biology of reproduction* 19 (4), S. 807–816. DOI: 10.1095/biolreprod19.4.807.

Horani, Amjad; Ferkol, Thomas W.; Dutcher, Susan K.; Brody, Steven L. (2016): Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. In: *Paediatric respiratory reviews* 18, S. 18–24. DOI: 10.1016/j.prrv.2015.09.001.

Horani, Amjad; Ustione, Alessandro; Huang, Tao; Firth, Amy L.; Pan, Jiehong; Gunsten, Sean P. et al. (2018): Establishment of the early cilia preassembly protein complex during motile ciliogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (6), E1221-E1228. DOI: 10.1073/pnas.1715915115.

Ishikawa, Takashi (2017): Axoneme Structure from Motile Cilia. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a028076.

Jain, Raksha; Pan, Jiehong; Driscoll, James A.; Wisner, Jeffrey W.; Huang, Tao; Gunsten, Sean P. et al. (2010): Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 43 (6), S. 731–739. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0328OC.

Jia, Ru; Li, Dongdong; Li, Ming; Chai, Yongping; Liu, Yufan; Xie, Zhongyun et al. (2019): Spectrin-based membrane skeleton supports ciliogenesis. In: *PLoS biology* 17 (7), e3000369. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000369.

Kalnins, V. I.; Chung, C. K.; Turnbull, C. (1972): Procentrioles in ciliating and ciliated cells of chick trachea. In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 135 (4), S. 461–471. DOI: 10.1007/BF00583430.

Kalnins, V. I.; Porter, K. R. (1969): Centriole replication during ciliogenesis in the chick tracheal epithelium. In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 100 (1), S. 1–30. DOI: 10.1007/BF00343818.

Kalweit, Ute (1998): Der Einfluß einer kurzzeitigen Hypothermie auf die Herzfrequenz und die Eiinnentemperatur von Hühnerembryonen unterschiedlichen Alters. Dissertation. Freie Universität Berlin. Veterinär-Physiologie.

Kaur, Ramandeep; Dikshit, Kanak L.; Raje, Manoj (2002): Optimization of immunogold labeling TEM: an ELISA-based method for evaluation of blocking agents for quantitative detection of antigen. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50 (6), S. 863–873. DOI: 10.1177/002215540205000612.

Kim, Dasom; Chen, Zi; Zhou, Lin-Fu; Huang, Shou-Xiong (2018): Air pollutants and early origins of respiratory diseases. In: *Chronic Diseases and Translational Medicine* 4 (2), S. 75–94. DOI: 10.1016/j.cdtm.2018.03.003.

Kiprilov, Enko N.; Awan, Aashir; Desprat, Romain; Velho, Michelle; Clement, Christian A.; Byskov, Anne Grete et al. (2008): Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. In: *The Journal of cell biology* 180 (5), S. 897–904. DOI: 10.1083/jcb.200706028.

Kirbas Dogan, Gülseren; Takici, Ismet (2018): Anatomy of Respiratory System in Poultry. In: *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, S. 141–147. DOI: 10.24880/maevfd.433946.

Knowles, Michael R.; Daniels, Leigh Anne; Davis, Stephanie D.; Zariwala, Maimoona A.; Leigh, Margaret W. (2013): Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188 (8), S. 913–922. DOI: 10.1164/rccm.201301-0059CI.

Kohli, Priyanka; Höhne, Martin; Jüngst, Christian; Bertsch, Sabine; Ebert, Lena K.; Schauss, Astrid C. et al. (2017): The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. In: *EMBO reports* 18 (9), S. 1521–1535. DOI: 10.15252/embr.201643846.

Lawson, Gregory W.; van Winkle, Laura S.; Toskala, Elina; Senior, Robert M.; Parks, William C.; Plopper, Charles G. (2002): Mouse Strain Modulates the Role of the Ciliated Cell in Acute Tracheobronchial Airway Injury-Distal Airways. In: *The American Journal of Pathology* 160 (1), S. 315–327. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64375-1.

Leigh, Margaret W.; Hazucha, Milan J.; Chawla, Kunal K.; Baker, Brock R.; Shapiro, Adam J.; Brown, David E. et al. (2013): Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for

primary ciliary dyskinesia. In: *Annals of the American Thoracic Society* 10 (6), S. 574–581. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201305-110OC.

Liebich, Hans-Georg; Budras, Klaus-Dieter (2010): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer. Online verfügbar unter [https://books.google.de/books?id=ATo7t\\_sGC7IC](https://books.google.de/books?id=ATo7t_sGC7IC).

Loots, G. P.; Nel, P. P. C. (1989): Early stages of ciliogenesis in the respiratory epithelium of the nasal cavity of rabbit embryos. In: *Cell Tissue Res.* 255 (3), S. 589–594. DOI: 10.1007/BF00218795.

Lucas, Jane S.; Barbato, Angelo; Collins, Samuel A.; Goutaki, Myrofora; Behan, Laura; Caudri, Daan et al. (2017): European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. In: *The European respiratory journal* 49 (1). DOI: 10.1183/13993003.01090-2016.

Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2015): Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.

Marigo, V.; Tabin, C. J. (1996): Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), S. 9346–9351. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9346.

Mast, J.; Nanbru, C.; van den Berg, T.; Meulemans, G. (2005): Ultrastructural changes of the tracheal epithelium after vaccination of day-old chickens with the La Sota strain of Newcastle disease virus. In: *Veterinary pathology* 42 (5), S. 559–565. DOI: 10.1354/vp.42-5-559.

Metzger, Roman; Wachowiak, Robin; Kluth, Dietrich (2011): Embryology of the early foregut. In: *Seminars in pediatric surgery* 20 (3), S. 136–144. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2011.03.004.

Micheva, Kristina D.; Smith, Stephen J. (2007): Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. In: *Neuron* 55 (1), S. 25–36. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.06.014.

Michler, Goerg H. (2019): Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.

Miller, Edward H.; Seneviratne, Sampath S.; Jones, Ian L.; Robertson, Gregory J.; Wilhelm, Sabina I. (2008): Syringeal anatomy and allometry in murrelets (Alcidae: Uria). In: *J Ornithol* 149 (4), S. 545–554. DOI: 10.1007/s10336-008-0304-z.

Miller, Leigh-Anne D.; Wert, Susan E.; Clark, Jean C.; Xu, Yan; Perl, Anne-Karina T.; Whitsett, Jeffrey A. (2004): Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 231 (1), S. 57–71. DOI: 10.1002/dvdy.20105.

Mizuno, Naoko; Taschner, Michael; Engel, Benjamin D.; Lorentzen, Esben (2012): Structural studies of ciliary components. In: *Journal of molecular biology* 422 (2), S. 163–180. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.05.040.

Nascimento, Antonio Paula; Santos, Jane Meri; Mill, José Geraldo; Toledo de Almeida Albuquerque, Taciana; Reis Júnior, Neyval Costa; Reisen, Valdério Anselmo; Pagel, Érica Coelho (2020): Association between the incidence of acute respiratory diseases in children and ambient concentrations of SO<sub>2</sub>, PM<sub>10</sub> and chemical elements in fine particles. In: *Environmental research* 188, S. 109619. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109619.

Neugebauer, Peter; Endepols, Heike; Mickenhagen, Axel; Walger, Martin (2003): Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. In: *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 260 (6), S. 325–330. DOI: 10.1007/s00405-002-0562-y.

Nonaka, Shigenori; Tanaka, Yosuke; Okada, Yasushi; Takeda, Sen; Harada, Akihiro; Kanai, Yoshimitsu et al. (1998): Randomization of Left–Right Asymmetry due to Loss of Nodal Cilia Generating Leftward Flow of Extraembryonic Fluid in Mice Lacking KIF3B Motor Protein. In: *Cell* 95 (6), S. 829–837. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81705-5.

Nüßlein, T.; Brinkmann, F.; Ahrens, P.; Ebsen, M.; Jung, A.; Kirchberger, W. et al. (2013): Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie. In: *Monatsschrift der Kinderheilkunde* 161 (5), S. 406–416. DOI: 10.1007/s00112-012-2798-y.

Omran, H. (2012): Novel genetic defects in primary ciliary dyskinesia affecting function of dynein arms and central pair apparatus. In: *Cilia* 1 (S1), O1. DOI: 10.1186/2046-2530-1-S1-O1.

Omran, H.; Häffner, K.; Völkel, A.; Kuehr, J.; Ketelsen, U. P.; Ross, U. H. et al. (2000): Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome 5p and identification of the heavy dynein chain DNAH5 as a candidate gene. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 23 (5), S. 696–702. DOI: 10.1165/ajrcmb.23.5.4257.

Omran, Heymut (2020): High-speed Video Microscopy Analysis (HVMA). Online verfügbar unter <https://www.medizin.uni-muenster.de/en/pcd/research/high-speed-video-microscopy-analysis-hvma/>, zuletzt aktualisiert am 20.06.2020, zuletzt geprüft am 20.06.2020.

Ozdemir Ovalioglu, Aysegul; Ovalioglu, Talat Cem; Canaz, Gokhan; Esen Aydin, Aysegul; Arslan, Sema; Sar, Mehmet; Emel, Erhan (2020): The Effects of Tartrazine on Neural Tube Development in the Early Stage of Chicken Embryos. In: *Turkish neurosurgery*. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.28793-19.6.

Papon, J. F.; Coste, A.; Roudot-Thoraval, F.; Boucherat, M.; Roger, G.; Tamalet, A. et al. (2010): A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. In: *The European respiratory journal* 35 (5), S. 1057–1063. DOI: 10.1183/09031936.00046209.

Pearson, Chad G.; Culver, Brady P.; Winey, Mark (2007): Centrioles want to move out and make cilia. In: *Developmental cell* 13 (3), S. 319–321. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.08.007.

Petersson, Bertil; Curvall, Margareta; Enzell, Curt R. (1982): Effects of tobacco smoke compounds on the ciliary activity of the embryo chicken trachea in vitro. In: *Toxicology* 23 (1), S. 41–55. DOI: 10.1016/0300-483X(82)90040-3.

Plopper, C. G.; Heidsiek, J. G.; Weir, A. J.; George, J. A.; Hyde, D. M. (1989): Tracheobronchial epithelium in the adult rhesus monkey: a quantitative histochemical and ultrastructural study. In: *The American journal of anatomy* 184 (1), S. 31–40. DOI: 10.1002/aja.1001840104.

Rademacher, J.; Buck, A.; Schwerk, N.; Price, M.; Fuge, J.; Welte, T.; Ringshausen, F. C. (2017): Messung des nasalen Stickstoffmonoxids und ein modifizierter PICADAR-Score als Screening für primär ciliäre Dyskinesie in Erwachsenen mit Bronchiektasen. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 71 (8), S. 543–548. DOI: 10.1055/s-0043-111909.

Reinke, Sebastian; Frank, Marcus; Reinke, Alexander (2021): Electron microscopic analysis of the development of multiciliated cells in the respiratory epithelium of the concha nasalis media in the chicken embryo. In: *Microscopy Conference MC2021 (Dreiländertagung), Proceedings unter LS2.P018, Rubrik Life Sciences (LS), Morpho-functional explorations of cells and organs (LS2)*.

Sakiyama, J.; Yokouchi, Y.; Kuroiwa, A. (2000): Coordinated expression of Hoxb genes and signaling molecules during development of the chick respiratory tract. In: *Developmental biology* 227 (1), S. 12–27. DOI: 10.1006/dbio.2000.9880.

Sale, W. S.; Besharse, J. C.; Piperno, G. (1988): Distribution of acetylated alpha-tubulin in retina and in vitro-assembled microtubules. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 9 (3), S. 243–253. DOI: 10.1002/cm.970090306.

Satir, Peter; Christensen, Søren Tvorup (2007): Overview of structure and function of mammalian cilia. In: *Annual review of physiology* 69, S. 377–400. DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236.

Shapiro, Adam J.; Leigh, Margaret W. (2017): Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: Genetic defects with normal and non-diagnostic ciliary ultrastructure. In: *Ultrastructural pathology* 41 (6), S. 373–385. DOI: 10.1080/01913123.2017.1362088.

Silverman, Michael A.; Leroux, Michel R. (2009): Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia. In: *Trends in Cell Biology* 19 (7), S. 306–316. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.04.002.

Song, Jie; Lu, Mengxue; Zheng, Liheng; Liu, Yue; Xu, Pengwei; Li, Yuchun et al. (2018): Acute effects of ambient air pollution on outpatient children with respiratory diseases in Shijiazhuang, China. In: *BMC Pulmonary Medicine* 18 (1), S. 150. DOI: 10.1186/s12890-018-0716-3.

Sorokin, S. P. (1968): Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. In: *Journal of Cell Science* 3 (2), S. 207–230.

Souma, T. (1987): The distribution and surface ultrastructure of airway epithelial cells in the rat lung: a scanning electron microscopic study. In: *Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku* 50 (4), S. 419–436. DOI: 10.1679/aohc.50.419.

Stern, Claudio D. (2005): The chick; a great model system becomes even greater. In: *Developmental cell* 8 (1), S. 9–17. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.11.018.

Sun, Shufeng; Fisher, Rebecca L.; Bowser, Samuel S.; Pentecost, Brian T.; Sui, Haixin (2019): Three-dimensional architecture of epithelial primary cilia. In: *PNAS* 116 (19), S. 9370–9379. DOI: 10.1073/pnas.1821064116.

Susan Swapp, University of Wyoming (2017): Scanning Electron Microscopy (SEM). Online verfügbar unter [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html), zuletzt aktualisiert am 26.05.2017, zuletzt geprüft am 07.12.2020.

Tang, Tang K. (2013): Centriole biogenesis in multiciliated cells. In: *Nature cell biology* 15 (12), S. 1400–1402. DOI: 10.1038/ncb2892.

Terré, Berta; Lewis, Michael; Gil-Gómez, Gabriel; Han, Zhiyuan; Lu, Hao; Aguilera, Mònica et al. (2019): Defects in efferent duct multiciliogenesis underlie male infertility in GEMC1-, MCIDAS- or CCNO-deficient mice. In: *Development (Cambridge, England)* 146 (8). DOI: 10.1242/dev.162628.

Terré, Berta; Piergiovanni, Gabriele; Segura-Bayona, Sandra; Gil-Gómez, Gabriel; Youssef, Sameh A.; Attolini, Camille Stephan-Otto et al. (2016): GEMC1 is a critical regulator of multiciliated cell differentiation. In: *The EMBO Journal* 35 (9), S. 942–960. DOI: 10.15252/embj.201592821.

Toskala, Elina; Smiley-Jewell, Suzette M.; Wong, Viviana J.; King, Dustin; Plopper, Charles G. (2005): Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289 (3), L454-9. DOI: 10.1152/ajplung.00036.2005.

Vertii, Anastassia; Hung, Hui-Fang; Hehnlly, Heidi; Doxsey, Stephen (2016): Human basal body basics. In: *Cilia* 5, S. 13. DOI: 10.1186/s13630-016-0030-8.

Vladar, Eszter K.; Stratton, Miranda B.; Saal, Maxwell L.; Salazar-De Simone, Glicella; Wang, Xiangyuan; Wolgemuth, Debra et al. (2018): Cyclin-dependent kinase control of motile ciliogenesis. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.36375.

Vollmerhaus, B. (2004): Anatomie der Vögel. 3., durchgesehene Aufl. Stuttgart: Parey (Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, / Richard Nickel, August Schummer, Eugen Seiferle ; 5). Online verfügbar unter [https://books.google.de/books?id=s\\_kgZeaFXVwC](https://books.google.de/books?id=s_kgZeaFXVwC).

Wachter, Stefanie; Jung, Jamin; Shafiq, Shahaan; Basquin, Jerome; Fort, Cécile; Bastin, Philippe; Lorentzen, Esben (2019): Binding of IFT22 to the intraflagellar transport complex is essential for flagellum assembly. In: *The EMBO Journal* 38 (9). DOI: 10.15252/embj.2018101251.

Wallmeier, Julia; Al-Mutairi, Dalal A.; Chen, Chun-Ting; Loges, Niki Tomas; Pennekamp, Petra; Menchen, Tabea et al. (2014): Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. In: *Nature genetics* 46 (6), S. 646–651. DOI: 10.1038/ng.2961.

Walsh, C.; McLelland, J. (1978): The development of the epithelium and its innervation in the avian extra-pulmonary respiratory tract. In: *Journal of Anatomy* 125 (Pt 1), S. 171–182.

Wang, Wei; Xu, Ruihuan; Li, Jinming (2010): Production of native bispecific antibodies in rabbits. In: *PloS one* 5 (6), e10879. DOI: 10.1371/journal.pone.0010879.

Wheway, Gabrielle; Mitchison, Hannah M. (2019): Opportunities and Challenges for Molecular Understanding of Ciliopathies-The 100,000 Genomes Project. In: *Frontiers in genetics* 10, S. 127. DOI: 10.3389/fgene.2019.00127.

Wingfield, Jenna L.; Lehtreck, Karl-Ferdinand; Lorentzen, Esben (2018): Trafficking of ciliary membrane proteins by the intraflagellar transport/BBSome machinery. In: *Essays in biochemistry* 62 (6), S. 753–763. DOI: 10.1042/EBC20180030.

Zaffuto, K. M.; Estevez, C. N.; Afonso, C. L. (2008): Primary chicken tracheal cell culture system for the study of infection with avian respiratory viruses. In: *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 37 (1), S. 25–31. DOI: 10.1080/03079450701774850.

Zhu, Jianjian; Trofka, Anna; Harfe, Brian D.; Mackem, Susan (2020): Sonic Hedgehog is not a limb morphogen but acts as a trigger to specify all digits. In: *bioRxiv*, 2020.05.28.122119. DOI: 10.1101/2020.05.28.122119.

## 6. Thesen

---

- I. Das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) eignet sich gut für die embryonale Forschung, da eine Bebrütung im Hühnerei erfolgt und somit eine exakte Altersbestimmung der Embryonen ermöglicht wird.
- II. Das Rasterelektronenmikroskop ist sehr gut geeignet, um die einzelnen Stadien der embryonalen Entwicklung und die Verteilung der monoziliären Zellen und multiziliären Zellen des respiratorischen Epithels in der Trachea zu untersuchen.
- III. Die Entstehung der multiziliären Zellen ist ein in wenigen Tagen schnell ablaufender Prozess, mit deutlichen Entwicklungsfortschritten in nur 12 Stunden.
- IV. Die lokalen Unterschiede in Bezug auf die zeitliche Entstehung der multiziliären Zellen sind deutlicher ausgeprägt als ein kraniokaudaler Entwicklungsgradient in der Trachea.
- V. Mit zunehmender Tiefe der Epithelfurchen des respiratorischen Epithels der Trachea nimmt die Anzahl der mono- und multiziliären Zellen am Grund ab.
- VI. Im embryonalen Entwicklungsalter E14 existieren nur Epithelzellen mit unterschiedlich langen Monozilien auf dem respiratorischen Epithel der Trachea. Multiziliäre Zellen sind im Stadium E14 nicht nachweisbar.
- VII. Im embryonalen Entwicklungsalter E 14,5 treten die ersten multiziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel der Trachea auf. Innerhalb von 12 Stunden zeigt sich eine Zunahme und beginnende Clusterbildung der multiziliären Zellen.
- VIII. Im embryonalen Entwicklungsalter E16 sind in den REM Aufnahmen mehr multiziliäre Zellen als monoziliäre Zellen auf dem respiratorischen Epithel der Trachea vorhanden.
- IX. Im embryonalen Entwicklungsalter E18 ist die Entwicklung der multiziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel der Trachea weitgehend komplettiert und flächendeckend abgeschlossen.

## 7. Anhang

---

### 7.1. Protokolle

---

Protokoll 1	Präparation der Embryonen
Protokoll 2	Kritische Punkt Trocknung / REM
Protokoll 3	Entwässerung mit Ethanol und Einbettung in LR-White / TEM
Protokoll 4	Kontrastierung der Ultradünnschnitte / TEM
Protokoll 5	Entwässerung mit Ethanol und Paraffin Einbettung / IF
Protokoll 6	Entparaffinierung der Schnitte / IF
Protokoll 7	Auftragen der Antikörper / IF
Protokoll 8	Besputtern der Probe mit Gold / REM
Protokoll 9	PBS Herstellung 1:10 Konzentration
Protokoll 10	Na-Phosphatpuffer Herstellung

## **Protokoll 1: Präparation der Embryonen**

Die Präparation des Hühnerembryos beginnt circa 30 Minuten nachdem das Hühnerei aus dem Inkubator entnommen und mit Eis gekühlt wurde. Für die Präparation von feinen Strukturen wird die Kombination aus einer Pinzette und einer Schere genutzt. Bei Embryonen welche jünger als E15 sind ist das Gewebe so weich, dass die Präparation nur mit zwei Pinzetten erfolgt. Es wurden folgende Präparationsschritte durchgeführt:

- Das obere Drittel des Hühnereis wird mit Tesafilm abgeklebt.
- Das Hühnerei wird ringförmig im oberen Drittel mit einer Schere eröffnet.
- Das Ei wird gedreht, der Embryo aus dem Ei entfernt und auf einer PBS gefüllten Petrischale gelagert. Der Kopf wird mit einem Schnitt von dem Körper getrennt (Dekapitation) und auf Eis gelegt
- Das linke Bein wird abgetrennt, die linke Großzehe wird zur Altersbestimmung ausgemessen.
- Der Körper des Embryos wird vorsichtig von ventral mit einer Pinzette ggf. Schere eröffnet.
- Die bereits angelegten Federn auf der Haut des Embryos werden mit einer Pinzette abgestreift. Der Thorax wird von medial weiter präpariert und die Lunge freigelegt.
- Von der Lunge aufsteigend wird die Trachea präpariert.
- Die kraniale Landmarke für die Trachea liegt im Bereich des Dekapitationsrandes. Die Trachea im Kopf wurde präpariert und ein ringförmiger Abschnitt entnommen. Die kaudale Landmarke für die Trachea ist die Insertionsstelle des M. sternotrachealis. Die Trachea wurde präpariert und ein ringförmiger Abschnitt entnommen.
- Die ringförmigen Proben der Landmarke 1 und 2 werden separat in PBS gewaschen, um Blutkoagel zu entfernen. Die Probengläser werden beschriftet und die passenden Proben separat in Glutalaldehyd im Probenkühlschrank bei 8 Grad Celsius zwischengelagert.

## **Protokoll 2: Kritische Punkt Trocknung / REM**

**Material:** Probenbehälter mit Proben in absolutem Aceton, Kohlendioxid Stahlflasche mit Steigrohr Kritisch Punkt Trockner, EMITECH K850

Die Proben befinden sich in PB falls in Fixativ 3x mit PBS spülen und Entwässern mit aufsteigender Acetonreihe

- 30 % Aceton            10 Sekunden
- 50 % Aceton            5 min
- 70 % Aceton            10 min
- 90 % Aceton            10 min
- 100 % Aceton          2 x 10 min

Anschließend wird die kritische Punkt Trocknung nach den Institutseigenen Standards durchgeführt.

1. Vor Beginn überprüfen, ob alle Ventile an der Trocknungsanlage und der CO<sub>2</sub>-Flasche geschlossen sind. Netzschalter betätigen. Die Heizung muss ausgeschaltet sein!
2. CO<sub>2</sub>-Flaschenventil langsam öffnen.
3. Ventil „COOL“ langsam öffnen und mit konstantem Gasstrom die Kammer auf +5°C herunterkühlen. Dabei den Deckel darauflegen, damit er auch abkühlt.
4. Sind +8° C erreicht, Ventil „COOL“ schließen. Die Kammertemperatur sinkt um 2,5° C weiter bis auf ca. +5° C.
5. 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 trockenfallen. (Eventuell nachkühlen.)
6. 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 Kammersichtfensters erscheint. Temperatur überprüfen und ggf. auf +5° C nachkühlen (Öffnen des Ventils „COOL“).
7. 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.
8. Ventil „EXHAUST“ schließen und Punkt 6 und 7 noch 2x wiederholen.
9. Nach dem letzten Ablassen Geruchskontrolle am Gasauslass, ob Gas noch Spuren von Ethanol oder Aceton enthält. Falls ja, Punkt 8 und 9 nochmals wiederholen.
10. Die Kammer nun wieder mit CO<sub>2</sub> füllen (Ventil „INLET“) und danach Heizung an der Vorderseite des Gerätes einschalten.
11. CO<sub>2</sub>-Flasche schließen.
12. 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 regelt 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).

13. 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.
14. 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.
15. Wenn der Kammerdruck auf 0 psi gefallen ist (Druckausgleich), werden alle anderen Ventile geöffnet sowie die Heizung ausgeschaltet. Die Probenkammer kann nun geöffnet werden.
16. Wird das Gerät nicht weiter benötigt, muss es über den Netzschalter auf der Rückseite ausgeschaltet werden.

### **Protokoll 3: Entwässerung mit Ethanol und Einbettung in LR-White / TEM**

Probe 2 x waschen in PBS, Entwässerung über die Ethanolreihe unter leichtem Schwenken:

- 30%            1 min
  - 50%            10 min
  - 75%            30 min
  - 90%            30 min
  - 100%           30 min
  - 100%           30 min
  - 100%           30 min
- 
- Infiltration mit Ethanol/LR-White (1:1 Mischung) über Nacht ohne Deckel unter dem Abzug. (Abdampfen des Ethanols).
  - Infiltration mit LR-White für ½ h, dann wechseln
  - Infiltration mit LR-White für 4 h.
  - Teilung der Biopsien.
  - Überführung der Proben in Gelatinekapseln.
  - Die Kapseln bis zum Rand mit LR-White befüllen und möglichst luftdicht verschließen (Beschriftung mit Bleistift).
  - Polymerisation für 1 bis 2 Tage bei 50° C.

Bemerkung: Nicht mit Osmiumtetroxid nachfixieren

## **Protokoll 4: Kontrastierung der Ultradünnschnitte / TEM**

### **Material:**

- Uranylacetat in wässriger Lösung
- Gridstick Glaspipette mit Gummistopfen
- Glaspipettenverschluss Aqua dest. Zellstofftücher

### **Durchführung:**

- Eppendorfröhrchen mit Uranylacetat ca. fünf bis sieben Minuten zentrifugieren. (15 000 U/min)
- Drei Schälchen mit Aqua dest. vorbereiten.
- Die Blenden auf den Gridstick kleben und den Gridstick in die Glaspipette mit Gummiballon legen.
- Aus der ersten Schale Wasser einsaugen und 30 Sekunden die Grids befeuchten.
- Das Wasser ablassen und die Pipette auf einem Tuch ausklopfen
- Das Uranylacetat aufsaugen und die Pipette mit einem Verschlusskämpchen verschließen.
- Vier Minuten das Uranylacetat in der Pipette wirken lassen, anschließend zurückgeben.
- Die Pipette abtupfen und zweimal mit Wasser aus der ersten Schale in Sonderabfallflasche spülen.
- Die Pipette wieder abtupfen.
- Mit dem Wasser aus der zweiten und dritten Schale je 5 x waschen, ab in Abfallglas, dazwischen und danach abtupfen.
- Den Gridstick aus der Glaspipette holen und die Grids zurück in die Schälchen räumen.
- Alle genutzten Materialien gut abwaschen.



## **Protokoll 6: Entparaffinierung der Schnitte / IF**

Entnahme der bei 40 Grad getrockneten Proben auf den Objektträgern aus dem Probenkasten und Überführung in die Entparaffinierung.

- Roti-Histol I                      10 Min.
- Roti-Histol II                      10 Min.
- 100% Ethanol I                      5 Min.
- 100% Ethanol                      5 Min.
- 75% Ethanol                      5 Min.
- 50% Ethanol                      3 Min.
- PBS                                      5 Min.

Anschließend Übertragung in eine feuchte Kammer.

## **Protokoll 7: Auftragen der Antikörper / IF**

**Material:** Hühnchen Trachea Paraffin Schnitte 10 µm  
Blockpuffer Standard ist 5% Normal Goat Serum in 1x PBS mit 0,1% Tween 20  
(aus 10% Stock 1:100)  
Primärantikörper: anti ac-Tub 1:1000

**Durchführung:**

Blockieren der Schnitte mit Blockpuffer für mindestens 1 Stunde  
50 µl Primärantikörper pro Schnitt auftragen

1 Stunde bei Raumtemperatur auf den Schnitten / über Nacht bei 4 Grad Celsius im  
Kühlschrank

Waschen: 3 x PBS mindestens 15 min (zweites PBS ggf. länger als 15 min)

Sekundärantikörper: anti mouse 1:300 verdünnt in Blockpuffer / PBS (1:10)

Waschen 2: 3x PBS min 15 min (zweites PBS ggf. länger als 15 min)

Eindeckeln: in Glycerol /PBS (90%/10%) ggf. versiegeln mit Nagellack für längere Lagerung

## **Protokoll 8: Besputtern der Probe mit Gold / REM**

**Material:** Proben auf Probentellern befestigt mit PLANO TEMPFIX, Stahlflasche mit Argon Gas, Sputter Coater

**Durchführung:**

1. Die Probenteller auf die Platte stellen, ca. auf der Höhe von 35 mm befinden.
2. Die Klappe mit Gefühl auf die Gummidichtung schließen.
3. Nun mit der linken Hand die Klappe zu drücken, mit der rechten das Ventil „Gas“ schließen und die Vakuumpumpe mit dem grünen Schalter einschalten.
4. Der Druck in der Kammer fällt sichtbar am roten Balken von rechts nach links ( $10^{-3}$  mbar).
5. Jetzt den Count-down-Timer auf 60 s stellen, warten bis das Vakuum aufgebaut ist und der rote Balken ganz links bei  $10^{-3}$  mbar zu sehen ist.
6. Mit dem Gas-Ventil langsam Argon einlassen, bis der rote Balken zwischen den schwarzen Markierungen steht. (zwischen  $5 \times 10^{-2}$  und  $7 \times 10^{-2}$  mbar)
7. Den Sputter-Strom mit „Current“ auf 20 mA einstellen (ca.  $\frac{1}{2}$  Umdrehung), auf „Start“ drücken und Sputter-Strom auf 20 mA halten.
8. Wenn die Zeit abgelaufen ist, den Sputter-Strom wieder auf Null stellen und das Gerät mit dem grünen Schalter ausstellen.
9. Kammer mit dem Argon Ventil belüften bis zum Druckausgleich
10. Die Proben herausnehmen und das Gas-Ventil des Sputter-Gerätes und die Argon Flasche schließen.

## Protokoll 9: PBS Herstellung 1:10 Konzentration

### 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 sekund res 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 auflösen.
2. Mit Aqua dest. auf 1l auffüllen.
3. Kristallbildung vor dem Benutzen durch Schütteln auflösen

## Protokoll 10: Na-Phosphatpuffer Herstellung

Lösung I    **0, 1 mol prim. Natriumphosphat**  
**13, 801 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O** oder 15, 602 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
 Ad 1000 ml Aqua dest.

Lösung II    **0,1 mol sek. Natriumphosphat**  
 14, 198 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O oder 26, 809 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
 oder 25, 817 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O ad 1000 ml Aqua dest  
 oder **17, 896 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O**

Zum Ansatz von 100 ml Puffer werden Lösung I und II in folgenden Mengen gemischt:

pH	Lösung I ml	Lösung II ml
5,3	97,4	2,6
5,5	96,0	4,0
5,7	93,6	6,4
5,9	90,1	9,9
6,1	84,9	15,1
6,3	77,5	22,5
6,5	68,3	31,7

pH	Lösung I ml	Lösung II ml
6,7	56,7	43,3
6,9	44,9	55,1
7,1	33,4    167,0	66,6    333,0
<b>7,3</b>	<b>23,2    116,0</b> 58,0	<b>76,8    384,0</b> 192,0
7,5	15,9	84,1
7,7	10,6	89,4
7,9	6,8	93,2

(Zwischen den einzelnen Werten ist lineare Interpolation möglich.)

### Phosphatpuffer nach Sørensen

0,4 mol        pH 7,2  
 ad 250 ml Aqua dest. statt 1000 ml

## 7.2. Besondere Bilder des respiratorischen Epithels

Der Übergang zwischen den Bronchioli und den Bronchioli terminales stellt eine weitere Besonderheit des respiratorischen Epithels dar. In diesem Abschnitt des tracheobronchialen Systems endet das Flimmerepithel abrupt und geht in ein nicht Zilien tragendes Epithel über.

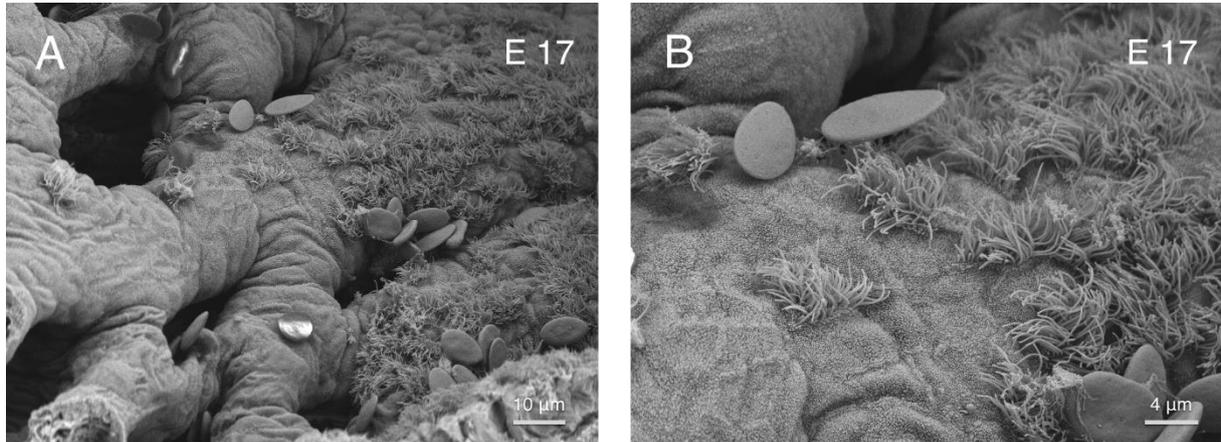


Abbildung 28: REM distaler Übergang des Flimmerepithels der Trachea E 17 ; Bild A: Vergrößerung von 1000 x; Bild B: Vergrößerung mit 2500 x; Quelle: eigene Bilder

Es besteht ein klar definierter Übergang zwischen den multiziliären Zellen und den nicht multiziliären Zellen. In den Entwicklungsstadien E 17 (Abbildung 28) und E 18 (Abbildung 29) ist dieser Übergang gut zu beurteilen, da das respiratorische Epithel in diesen embryonalen Entwicklungsstadien fast, beziehungsweise komplett entwickelt ist. Die einzelnen multiziliären Zellen im Bereich des Übergangs sind auch bei einer Vergrößerung von 4000 x grob makroskopisch nicht von den multiziliären Zellen im kranialen Bereich der Trachea zu unterscheiden.

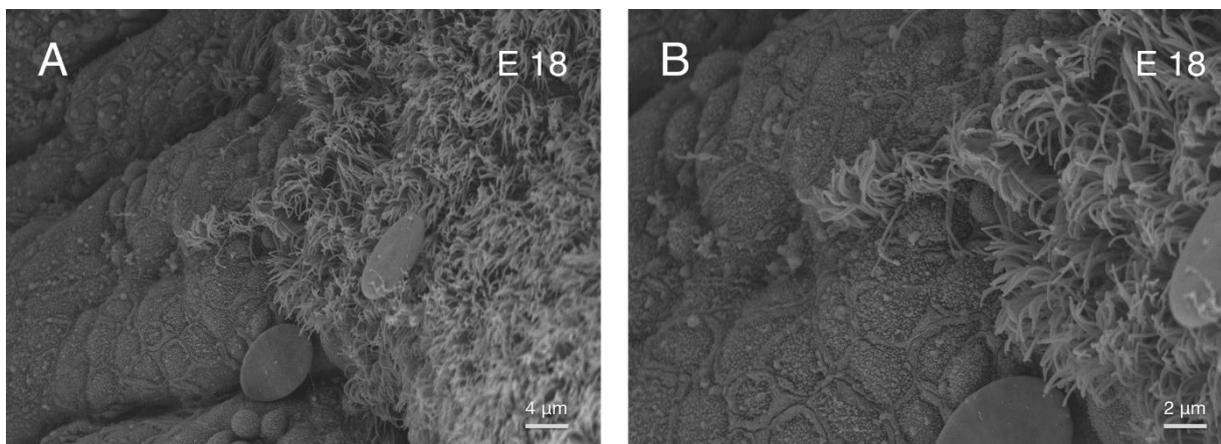


Abbildung 29: REM distaler Übergang des Flimmerepithels der Trachea E 18 ; Bild A: Vergrößerung von 2000 x; Bild B: Vergrößerung mit 4000 x; Quelle: eigene Bilder

### **7.3. Veröffentlichungen**

---

Im Rahmen des 113th jährlichen Treffen der anatomischen Gesellschaft, welches in der Anatomie der Universitätsmedizin Rostock (Gertrudenstraße 9, 18057 Rostock) stattgefunden hat, sind am 28.09.2018 bereits die vorläufigen Ergebnisse bezüglich der zeitlichen Entwicklungsphasen der multiziliären Zellen des embryonalen respiratorischen Epithels, in Form eines Posters vorgestellt worden.

Der Fokus lag damals sowohl auf der Verdeutlichung der zeitlichen Zunahme der multiziliären Zellen auf dem respiratorischen Epithel der Trachea, als auch auf der Hervorhebung des embryonalen Entwicklungsstadiums E16, ab welchem mehr multiziliäre Zellen, als monoziliäre Zellen vorhanden sind. Aus Platzgründen konnten damals die Themen der multiziliären Clusterbildung, sowie die verwandte Thematik des kraniokaudalen Entwicklungsgradienten in der Trachea, im Rahmen des Posters nicht präsentiert werden.

Das originale Poster befindet sich aktuell als Aushang im Eingangsbereich des elektronenmikroskopischen Instituts der Universität Rostock. Die Inhalte stehen als Zusammenfassung auch online auf der Website der Anatomischen Gesellschaft zur Verfügung.

## 7.4. Lebenslauf

---

Name: Alexander Reinke

Geburtsdatum: 14.05.1996

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung:

2002: Einschulung in der Grundschule in Leezen

2006: Goethe Gymnasium in Schwerin

2008: Gymnasium am Sonnenberg in Crivitz

2014: Abitur am Gymnasium am Sonnenberg in Crivitz

### Studium:

2014: Immatrikulation Uni Rostock, Humanmedizin

2016: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M1) in Rostock

2016: Beginn der Doktorarbeit

2019: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M2) in Rostock

2019 - 20: Praktisches Jahr

11 / 2020: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M3) in Rostock

### Berufstätigkeit:

01 / 2021: Arzt in Weiterbildung in der Radiologie der Helios Klinik Schwerin

Datum 26.01.2022

Unterschrift

## **7.5. Danksagung**

---

Die Möglichkeit an dem elektronenmikroskopischen Institut der Universität Rostock zu Forschen hat mich persönlich sehr bereichert. Doch ohne die jahrelange Unterstützung zahlreicher Menschen, sowohl in meinem persönlichen als auch in meinem beruflichen Umfeld, wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Zu allererst möchte ich mich bei PD Dr. sc. nat. Marcus Frank sowohl für die jahrelange persönliche Betreuung und Einarbeitung im Labor, als auch für die gemeinsame Vorbereitung und Präsentation der Ergebnisse auf den Kongressen bedanken.

Das gesamte Team des elektronenmikroskopischen Instituts der Universität Rostock hat mich von Anfang an freundlich aufgenommen und mich jederzeit unterstützt. Mein besonderer Dank gilt Frau Ute Schulz für die persönliche Einarbeitung in die Herstellung der elektronenmikroskopischen Proben, sowie gilt Dr. rer. nat. Armin Springer für die persönliche Betreuung an dem Rasterelektronenmikroskop.

Darüber hinaus möchte ich mich für die bedingungslose Unterstützung meiner Familie bedanken. Egal in welcher Situation oder Lebenslage ich mich befand, ihr wart immer für mich da und dafür bin ich unglaublich dankbar.

## **7.6. Eidesstattliche Versicherung**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

\_\_\_\_\_  
(Abgabedatum)

\_\_\_\_\_  
(Vollständige Unterschrift)