

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Aus dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock

Leiter: PD Dr. sc. nat. Markus Frank

**Entwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle -
rasterelektronenmikroskopische und immunzytochemische
Untersuchungen am embryonalen Haushuhn**

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

Vorgelegt von
Sebastian Reinke, geb. am 28.01.1998 in Schwerin
aus Leezen
Rostock, 08.07.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004464

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

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

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Robert Mlynski
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Arnold
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Freiburg

Datum der Einreichung: 08.07.2022

Datum der Verteidigung: 11.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
1. Einleitung	1
1.1 Das Haushuhn als Modellorganismus.....	1
1.2 Anatomie der Nasenhöhle des Haushuhns.....	2
1.2.1 Concha nasalis rostralis	4
1.2.2 Concha nasalis media und Concha nasalis caudalis	5
1.3 Histologie des respiratorischen Epithels	6
1.4 Morphologie und Physiologie der Zilien	7
1.4.1 Basalkörper und Transitionszone	8
1.4.2 Binnenarchitektur der Zilien.....	10
1.4.3 Zilienmembran und Zilienspitze	10
1.5 Ziliogenese	12
1.5.1 Phasen der Ziliogenese.....	12
1.5.2 Modell der Ziliogenese im respiratorischen Epithel.....	14
1.6 Ziliopathien	15
1.6.1 Bardet-Biedl-Syndrom	16
1.6.2 Primäre Ziliäre Dyskinesie.....	17
2. Hintergrund der Dissertation und Zielstellung	20
3. Materialien und Methoden	22
3.1 Materialien	22
3.1.1 Technische Anlagen/Geräte	22
3.1.2 Software.....	23
3.1.3 Verbrauchsgüter.....	23
3.1.4 Chemikalien	23
3.1.5 Kits und Reagenzien	24
3.1.6 Puffer und Lösungen	24
3.1.7 Antikörper.....	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Inkubation der Hühnereier und Probenverarbeitung	25

3.2.2	Probenverarbeitung für die Rasterelektronenmikroskopie	26
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopie	28
3.2.4	Artefakte bei der Rasterelektronenmikroskopie	29
3.2.5	Probenvorbereitung für die Immunofärbung und die H&E Färbung	30
3.2.6	Immunofärbung	31
3.2.7	H&E Färbung	33
3.2.8	Untersuchungsbereich in der Nasenhöhle	34
4.	Ergebnisse	37
4.1	Embryonale Entwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle	37
4.1.1	Formen zilientrager Epithelzellen.....	37
4.1.2	Concha nasalis media - Rasterelektronenmikroskopie	45
4.1.3	Concha nasalis media - Immunofärbung	52
4.1.4	Nasenhöhlendach/Nasenseptum - Rasterelektronenmikroskopie	56
4.1.5	Nasenhöhlendach/Nasenseptum - Immunofärbung.....	60
4.1.6	Besonderheiten der Epithelfurchen	63
4.1.7	Vergleich der Epithelentwicklung in der Nasenhöhle	66
5.	Diskussion	67
5.1	Diskussion der Materialien und Methoden	67
5.1.1	Verwendung des Haushuhns als Modellorganismus	67
5.1.2	Rasterelektronenmikroskopie	68
5.1.3	Immunofärbung und H&E Färbung	69
5.2	Diskussion der Ergebnisse	71
5.2.1	Entwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle.....	71
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	79
6.	Thesen zur Dissertation	80
7.	Literaturverzeichnis.....	82
8.	Anhang	93
8.1	Protokolle	93
8.2	Besondere Aufnahmen der Nasenhöhle	102
8.3	Veröffentlichungen.....	103
8.4	Lebenslauf.....	104
8.5	Danksagung	105
8.6	Eidesstattliche Erklärung	106

Abkürzungsverzeichnis

anti-ac-Tub-Ak	Antikörper gegen acetyliertes alpha Tubulin
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
CRS	chronische Rhinosinusitis
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
E	Embryonaler Entwicklungstag
H&E Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSVA	engl. <i>high-speed video microscopy analysis</i>
IFT	Intraflagellarer Transport
JS	Joubert-Syndrom
KPT	Kritisch-Punkt-Trocknung
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
nNO	nasales Stickstoffmonoxid, engl. <i>nasal nitric oxide</i>
OFD	Oro-fazio-digitales-Syndrom
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween®-20
PCD	Primäre Ziliäre Dyskinesie
PCM	Perizentrioläre Matrix
PFA	Paraformaldehyd
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGMC	Reduced generation of Multiple Motile Cilia
SPF Eier	spezifisch pathogenfreie Eier
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
USH	Usher-Syndrom
Vergr.	Vergrößerung

Abbildungsverzeichnis

1	Korrelation zwischen menschlicher- und aviärer embryonaler Entwicklung.....	2
2	Sagittalschnitte durch den Kopf eines adulten Haushuhns.....	3
3	REM/H&E Färbung - Koronarschnitte durch die Concha nasalis rostralis	4
4	REM/H&E Färbung - Koronarschnitte durch die Concha nasalis media et caudalis ...	5
5	Aufbau von motilen Zilien im Längs- und Querschnitt	7
6	Schematischer Aufbau eines motilen Ziliums/Zentriolen	8
7	TEM - motile Zilien im Längsschnitt	9
8	REM - Multiziliäre Zelle - E15.....	11
9	TEM - Deuterosomen und Prozentriolen	13
10	Modell der Differenzierung einer embryonalen respiratorischen Epithelzelle.....	14
11	Klinische Symptome und Erkrankungen bei Ziliopathien.....	15
12	Diagnostik Algorithmus bei PCD Verdacht.....	18
13	Management der Primären Ciliären Dyskinesie (PCD).....	19
14	Fließschema und Überblick zu den verwendeten Methoden	25
15	PFA fixierter Hühnerkopf im Stadium E13 und Präparierbesteck	26
16	Hühnerköpfe in den Stadien E13 und E18	27
17	REM - Artefakte bei der REM Untersuchung der Regio respiratoria.....	29
18	Schema des Prinzips der verwendeten Biotin-Streptavidin Immunofärbung.....	32
19	REM/H&E Färbung - rostraler Epithelübergang	34
20	REM/Immunofärbung - kaudaler Epithelübergang	35
21	REM - Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium/Teil 1	38
22	REM - Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium/Teil 2	39
23	REM - Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium.....	40
24	REM - unreife multiziliäre Zellen	41
25	REM - reife multiziliäre Zellen/Teil 1.....	42
26	REM - reife multiziliäre Zellen/Teil 2.....	43
27	REM - Epithel der Concha nasalis media - E12 bis E14.....	45
28	REM - Epithel der Concha nasalis media - E14,5/Teil 1	46
29	REM - Epithel der Concha nasalis media - E14,5/Teil 2	47
30	REM - Epithel der Concha nasalis media - E15/E16	49
31	REM - Epithel der Concha nasalis media - E17/E18	50
32	Immunofärbung/H&E - Koronarschnitt durch den embryonalen Hühnerkopf	52
33	Immunofärbung/H&E - Concha nasalis media - E12 bis E14,5	53
34	Immunofärbung/H&E - Concha nasalis media - E15 und E16	54
35	Immunofärbung/H&E - Concha nasalis media - E17 und E17,5	55

36	REM - Epithel des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums - E12/E13.....	56
37	REM - Epithel des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums - E14.....	57
38	REM - Epithel des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums - E14,5/E15.....	57
39	REM - Epithel vom Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E16	58
40	Immunofärbung/H&E - Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E12/E13	60
41	Immunofärbung/H&E - Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E14/E15	61
42	Immunofärbung/H&E – Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E16/E17.....	62
43	REM - Epithelfurchen der Regio respiratoria - E18	63
44	Immunofärbung/H&E - Epithelfurchen des Nasenseptums - E15/E17.....	64
45	Immunofärbung/H&E - Epithelfurchen - E17	65

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht einiger Ziliopathien	15
2	Auflistung der verwendeten technischen Geräte mit dem Hersteller	22
3	Formen zilientragender Epithelzellen während der Entwicklung.....	44
4	Zusammenfassung der REM Ergebnisse der Concha nasalis media	51
5	Zusammenfassung der REM Ergebnisse vom Nasenhöhlendach/Nasenseptum	59
6	Vergleich der Epithelentwicklung zwischen zwei Lokalisationen in der Nasenhöhle..	66
7	Vergleich der Epithelentwicklung zwischen der Nasenhöhle und der Trachea	75

Zusammenfassung

Hintergrund: Über die embryonale Entwicklung des respiratorischen Epithels ist wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe am EMZ Rostock der Respirationstrakt am Modellorganismus des Haushuhns (var. White Leghorn) in unterschiedlichen embryonalen Stadien und Lokalisationen erforscht (Hempel 2017; Greulich 2019; Reinke 2022). Diese Dissertation beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Untersuchung der Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle, an den Lokalisationen der Concha nasalis media und dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum, am selben Modellorganismus, in Hinblick auf die Ausprägung von zilientragenden Zellen im Zellverband.

Methoden: Diese Thematik wurde mit der Rasterelektronenmikroskopie, sowie der Immunofärbung mit einem Zilienmarker und der H&E Färbung an koronaren Paraffinschnitten, von Hühnerembryonen (var. White Leghorn) der Stadien E12 bis E18, bearbeitet.

Ergebnisse: Während der embryonalen Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle lassen sich unterschiedliche Arten zilientragender Epithelzellen nachweisen. In charakteristischer Abfolge treten Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium, Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, unreife multiziliäre Zellen sowie reife multiziliäre Zellen im Zellverband auf. Bereits im Stadium E12 existieren Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium an beiden Lokalisationen im Zellverband. Ab dem Stadium E13 finden sich einzelne Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium auf dem Nasenhöhlendach und ab dem Stadium E14,5 auf der Concha nasalis media. Auf der Concha nasalis media treten erste unreife multiziliäre Zellen im Stadium E14,5 auf und im Stadium E18 ist die Epithelentwicklung mit einem flächendeckenden Besatz an reifen multiziliären Zellen abgeschlossen. Im Bereich des Nasenhöhlendachs, mit dem angrenzenden Nasenseptum, kommen erste unreife multiziliäre Zellen bereits im Stadium E14 vor, ein geschlossener Zellverband reifer multiziliärer Zellen findet sich im Stadium E16. Auf dem Nasenhöhlendach, mit dem angrenzenden Nasenseptum, ist die Epithelreifung in Hinblick auf den Besatz mit multiziliären Zellen, circa 2 Tage früher abgeschlossen als auf der Concha nasalis media. In den tiefen Epithelfurchen kommen Epithelzellen ohne Zilienbesatz an ihrer Oberfläche vor. Dieses Phänomen ist an beiden untersuchten Lokalisationen identisch.

Schlussfolgerung: Respiratorische Erkrankungen, mit einer gestörten mukoziliären Clearance, haben eine zunehmende Bedeutung im klinischen Alltag. Mit den Erkenntnissen dieser Dissertation können Regenerationsprozesse nach Infektionen und Schädigungen des respiratorischen Epithels besser verstanden (Basil et al. 2020) und damit Forschungen im Bereich neuer Therapieansätze von Erkrankungen des zilientragenden Gewebes, wie zum Beispiel bei der PCD, vorangetrieben werden (Zerres 2010; Paff et al. 2021).

1. Einleitung

Erkrankungen im Bereich des Respirationstraktes haben in der klinischen Praxis eine große Bedeutung. Das respiratorische Epithel des Menschen ist im Zusammenhang mit der SARS-CoV-2 Pandemie aktueller Forschungsgegenstand. Es konnte gezeigt werden, dass im respiratorischen Epithel, im Bereich der Conchae nasales des Menschen, Proteine exprimiert werden (ACE2 und TMPRSS2), welche den Eintritt des Virus in die Zellen ermöglichen (Sungnak et al. 2020). In diesem Bereich manifestieren sich neben den häufigen infektiösen Pathologien auch hereditäre Erkrankungen der Zilien des respiratorischen und olfaktorischen Epithels. Durch Fortschritte in der genetischen Diagnostik lassen sich die syndromalen Ziliopathien, welche als klinisch unterdiagnostiziert gelten, besser erkennen (Horani et al. 2016; Forsythe et al. 2018). Ziliopathien sind insgesamt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, welche sich mit unterschiedlichen strukturellen und embryologischen Defekten in vielen Organsystemen des Menschen ausprägen. Um die Pathogenese von Erkrankungen, die sich im Bereich des respiratorischen Epithels manifestieren, besser verstehen zu können, ist Grundlagenforschung zur Entstehung der Zilien auf dieser Epithelart essenziell.

Der Schwerpunkt dieser Dissertation liegt auf der Untersuchung des zeitlichen und örtlichen Auftretens von Zilien, während der Ausbildung des respiratorischen Epithels im Bereich der Nasenhöhle des Haushuhns (*var. White Leghorn*), in dessen embryonaler Entwicklung. Dabei werden verschiedene embryonale Entwicklungsstadien systematisch untersucht.

1.1 Das Haushuhn als Modellorganismus

Da die Forschung an menschlichen Embryonen aus ethischen Erwägungen und dementsprechend laut Embryonenschutzgesetz (ESchG) vom 13.12.1990 nur eingeschränkt möglich ist, verwendet die Wissenschaft Zellkultur- und Tiermodelle. Das Haushuhn wird als Modellorganismus traditionell bereits in vielen wissenschaftlichen Bereichen, wie zum Beispiel der Entwicklungsbiologie, Zellbiologie, Virologie und Krebsforschung verwendet. Auch die Forschung am Genom des Haushuhns ist Teil aktueller wissenschaftlicher Arbeiten (Stern 2005). Vögel, insbesondere Hühner, machen in der europäischen Union bis zu 6 Prozent aller Versuchstiere aus (EU Bericht 2018). Hühnerembryonen können für die Forschung unter anderem aus spezifisch pathogenfreien Eiern (SPF Eier), unter standardisierten Bedingungen produziert werden und haben eine Inkubationszeit von durchschnittlich 21 Tagen. Die SPF Eier werden auch für die Vakzin Produktion verwendet (Gagnieur et al. 2014). Diese Merkmale machen Hühnerembryonen zu idealen Modellorganismen in der entwicklungsbiologischen und biomedizinischen Forschung (Bjørnstad et al. 2015). Hühner werden bereits seit längerer Zeit auch zur Erforschung von Zilien im Bereich des respiratorischen Flimmerepithels eingesetzt, wie zum

Einleitung

Beispiel zur Untersuchung von Schäden der Zilien nach Virusinfektionen (Sakakura et al. 1985). Für die wissenschaftliche Vergleichbarkeit, der am Tiermodell Huhn gewonnenen Ergebnisse, ist die Bestimmung und Validierung des genauen embryonalen Entwicklungstages (E) der Hühnereier essenziell. Die Bebrütung der Hühnereier im Brutapparat erlaubt die stundengenaue exakte Entnahme der Hühnerembryonen. Im Vergleich zu anderen Modellorganismen ist somit auch die Untersuchung von halben Entwicklungstagen (z. B. E14,5) problemlos möglich. Hühnerembryonen besitzen eine durchschnittliche Inkubationszeit von 21 Tagen.

Bereits seit dem Jahr 1951 gibt es eine Normaltafel der Hühnchenentwicklung, die unter anderem eine genaue Korrelation der Großzehenlänge der Hühnerembryonen mit ihrem embryonalen Entwicklungstag validiert hat. So besitzt laut Hamburger und Hamilton ein Hühnerembryo des Stadiums E15 (Hühnerembryo am 15. Bebrütungstag) eine Großzehe (3. Zehe) mit einer Länge von $14,9 \text{ mm} \pm 0,8 \text{ mm}$ (Hamburger und Hamilton 1992). Eine Korrelation zwischen menschlicher embryonaler Entwicklung und der des Haushuhns wurde in einer Arbeit von Bjørnstad beschrieben (Abbildung 1). So entspricht zum Beispiel das erste menschliche Trimester dem 1. bis 7. Bebrütungstag des Haushuhns (Bjørnstad et al. 2015).

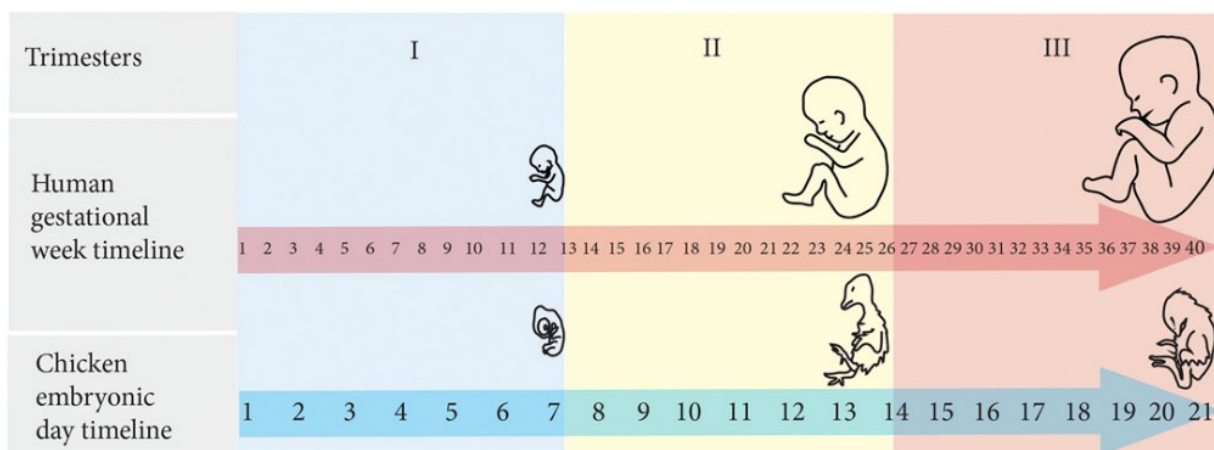


Abbildung 1: Korrelation zwischen menschlicher- und aviärer embryonaler Entwicklung. Quelle: modifiziert nach (Bjørnstad et al. 2015)

1.2 Anatomie der Nasenhöhle des Haushuhns

Die in dieser Dissertation bearbeiteten Zielstrukturen befinden sich in der Nasenhöhle (*Cavitas nasalis*) des embryonalen Haushuhns und betreffen die Concha nasalis media und die Concha nasalis caudalis mit den verschiedenen Epithelien.

Die Nasenhöhle des Haushuhns besteht aus zwei kommunizierenden Hohlräumen, dem Nasenvorhof (*Vestibulum nasi*) und der Nasenhaupthöhle (*Cavum nasi proprium*). Der Nasenvorhof ist mit Plattenepithel ausgekleidet und enthält eine Knorpellamelle, welche auch als Concha nasalis rostralis (Abbildung 2, a) bezeichnet wird. Die Nasenhaupthöhle befindet sich kaudal, hinter dem Nasenvorhof und gliedert sich in die Regio respiratoria mit der Concha nasalis

Einleitung

media, welche auch Concha nasalis ventralis genannt wird (Abbildung 2, b) und die Regio olfactoria mit der Concha nasalis caudalis, die auch als Concha nasalis dorsalis bezeichnet wird (Abbildung 2, c) (Casteleyn et al. 2018). Die Regio respiratoria ist mit dem respiratorischen Epithel ausgekleidet, während die Regio olfactoria ein olfaktorisches Epithel enthält. Die drei Conchae nasales des Haushuhns sind rostrokaudal (schnabelwärts - schwanzwärts) hintereinander angeordnet. Aus diesem Grund werden sie als Concha nasalis rostralis (Abbildung 2, a), Concha nasalis media (Abbildung 2, b) und Concha nasalis caudalis (Abbildung 2, c) bezeichnet (McLelland 1991; Vollmerhaus et al. 2004; Salomon et al. 2008; König 2009; Casteleyn et al. 2018). Bei den Säugetieren liegen diese im Gegensatz dazu kranio-kaudal übereinander. Die Funktionen der Conchae nasales bestehen in der Filterung, dem Anfeuchten und Anwärmen der Atemluft und in der Riechfunktion (McLelland 1991).

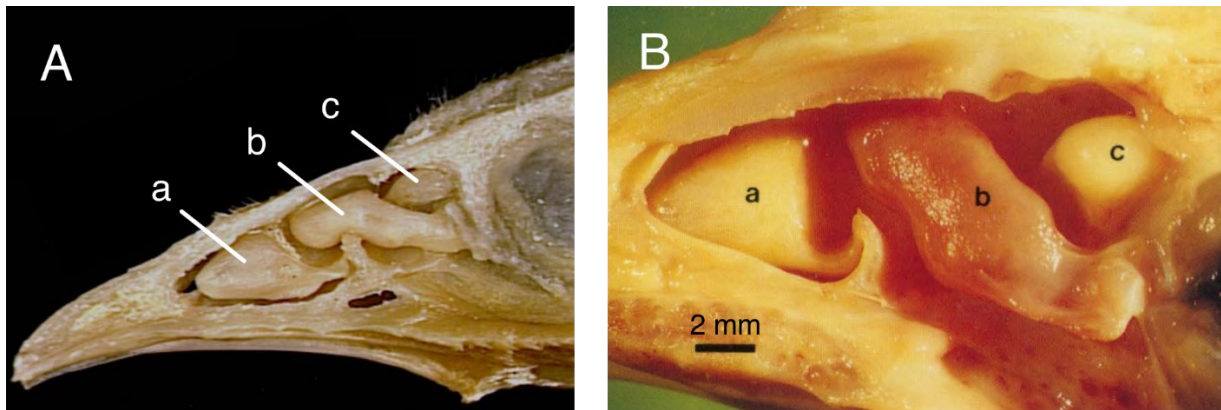


Abbildung 2: Sagittalschnitte durch den Kopf eines adulten Haushuhns. Das Septum nasi wurde entfernt. Blick von medial auf die rechte Nasenhöhle. (a) Concha nasalis rostralis, (b) Concha nasalis media, (c) Concha nasalis caudalis. Quelle Bild A: modifiziert nach (Kirbas Dogan und Takici 2018); Quelle Bild B: modifiziert nach (McLelland 1991, S. 95).

Die Nasenhaupthöhle ist knöchern durch die Kopfknochen (*Ossa faciei*) begrenzt und wird durch das Nasenseptum (*Septum nasi*) in die rechte und linke Nasenhöhle getrennt. Die inspirierte Luft gelangt über die Nasenlöcher (*Nares*) in den Nasenvorhof. Die Nasenlöcher werden durch die Vertikallamelle und eine Knorpelplatte (*Operculum*) spaltförmig eingeeengt und sind mit Borstenfedern ausgekleidet (McLelland 1991; Vollmerhaus et al. 2004; Casteleyn et al. 2018). Im kaudalen Teil des Nasenvorhofs gibt es eine Verbindung zur Nasenhaupthöhle. Aus der Nasenhaupthöhle kann die Luft durch einen Spalt im Gaumen (Choanenspalt) in den Oropharynx strömen (Casteleyn et al. 2018). Dies ist eine Besonderheit in der Anatomie des Haushuhns im Vergleich zum Menschen, wo die inspirierte Luft in den Nasopharynx strömt. Beim Haushuhn befindet sich der Choanenspalt unterhalb der Conchae nasales, wobei auf dieser Höhe das Nasenseptum inkomplett ist, sodass die rechte und linke Nasenhöhle miteinander in Verbindung stehen (McLelland 1991, S. 96).

Der Sinus infraorbitalis ist die größte Nasennebenhöhle im Haushuhn und steht über die *Apertura sinus infraorbitalis* mit der Nasenhaupthöhle in Verbindung. Der Sinus erstreckt sich

Einleitung

lateral der Nasenhöhle sowie rostral und ventral des Auges (McLelland 1991; Vollmerhaus et al. 2004; Salomon et al. 2008). Der rostrale Teil des Sinus infraorbitalis ist mit Schleimhaut bedeckt, während der kaudale Teil zilienträgendes Epithel besitzt (Casteleyn et al. 2018).

1.2.1 Concha nasalis rostralis

Die Concha nasalis rostralis ist die einzige Concha, welche sich im Nasenvorhof befindet. Sie ist eine gebogene C-förmige Knorpellamelle, welche sich von lateral kommend (*Operculum*) nach medial in Richtung des Nasenseptums einstülpt (Casteleyn et al. 2018). In der Abbildung 3 sind Koronarschnitte durch den Nasenvorhof im Stadium E17, auf Höhe der Concha nasalis rostralis, lichtmikroskopisch nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E Färbung) auf Paraffinschnitten und in der Rasterelektronenmikroskopie (REM) an Gewebepreparationen, vergleichend dargestellt.

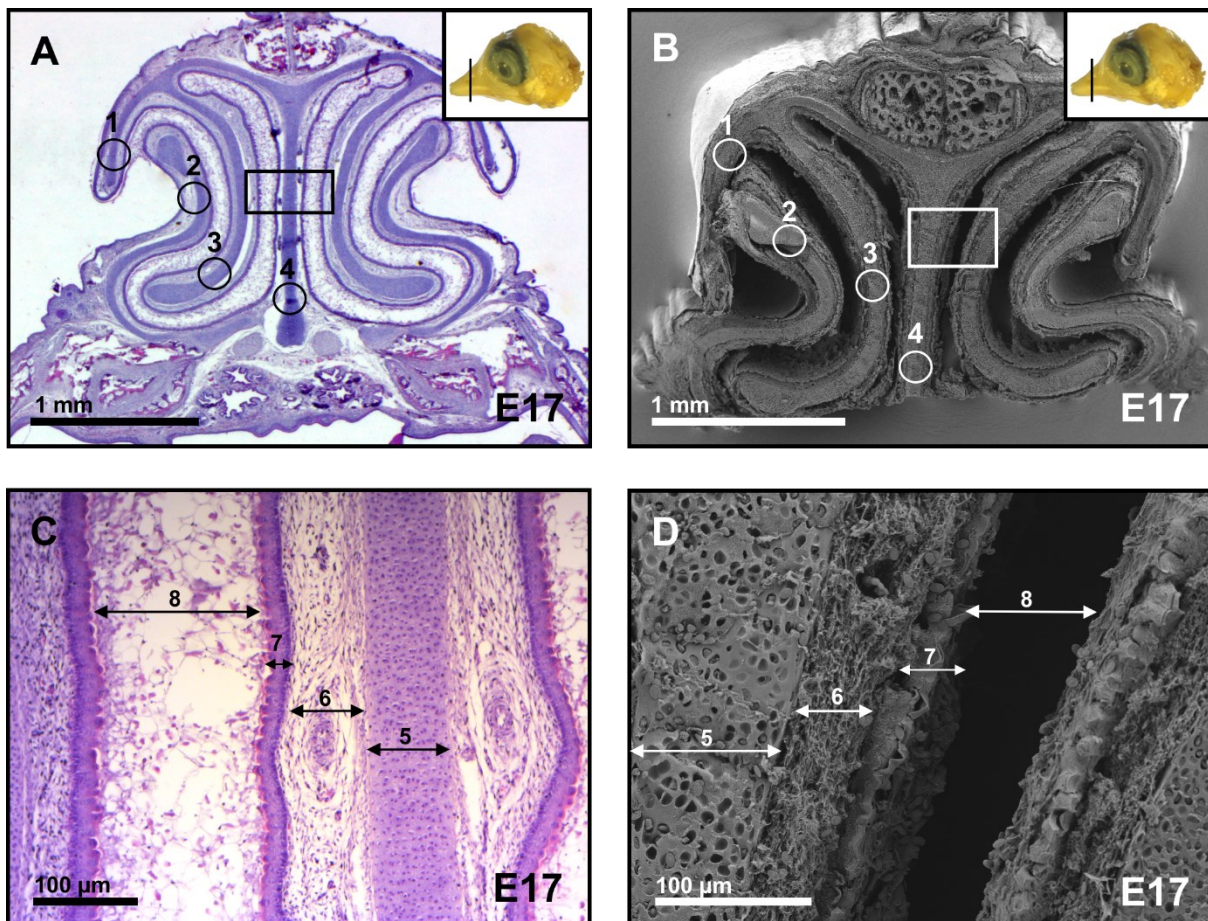


Abbildung 3: REM/H&E Färbung - Koronarschnitte durch die Concha nasalis rostralis

Die Abbildung 3 zeigt einen direkten Vergleich zwischen Koronarschnitten der Nasenhöhle auf Höhe der Concha nasalis rostralis mit den Methoden der H&E Färbung und der REM im Stadium E17. Die Bilder A und C sind koronare Paraffinschnitte mit einer H&E Färbung (Bild C ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Bild A). Die Bilder B und D sind koronare REM Aufnahmen (Bild D ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Bild B). Die Bilder A und B enthalten ein Piktogramm des Hühnerkopfes mit der koronaren Schnittebene. (1) Operculum, (2) Vertikallamelle, (3) Concha nasalis rostralis, (4) Septum nasi, (5) Knorpelgewebe des Nasenseptums, (6) Bindegewebe mit Blutgefäßen (Lamina propria), (7) embryonales Plattenepithel, (8) Vestibulum nasi. Quelle: eigene Darstellung

Einleitung

Die Concha nasalis rostralis (Bild A und B, 3) besitzt eine enge anatomische Beziehung zum Nasenloch, welches durch das Operculum (Bild A und B, 1) und die Vertikallamelle (Bild A und B, 2) spaltförmig eingeeengt wird. Das Nasenseptum (Bild A und B, 4), sowie die Concha nasalis rostralis (Bild A und B, 3) setzen sich aus mehreren Schichten zusammen. Innen befindet sich das Knorpelgewebe (Bild C und D, 5), daraufhin folgt eine Schicht Bindegewebe (Bild C und D, 6), welche auch als *Lamina propria* bezeichnet wird und an der Oberfläche liegt das Plattenepithel (Bild C und D, 7). Im Nasenvorhof (Bild C und D, 8) sind Schleim und abgeschilferte Plattenepithelzellen zu erkennen.

1.2.2 Concha nasalis media und Concha nasalis caudalis

In der Nasenhaupthöhle (Abbildung 4) befinden sich die Concha nasalis media (Bild A, B, D) und die Concha nasalis caudalis (Bild C und D).

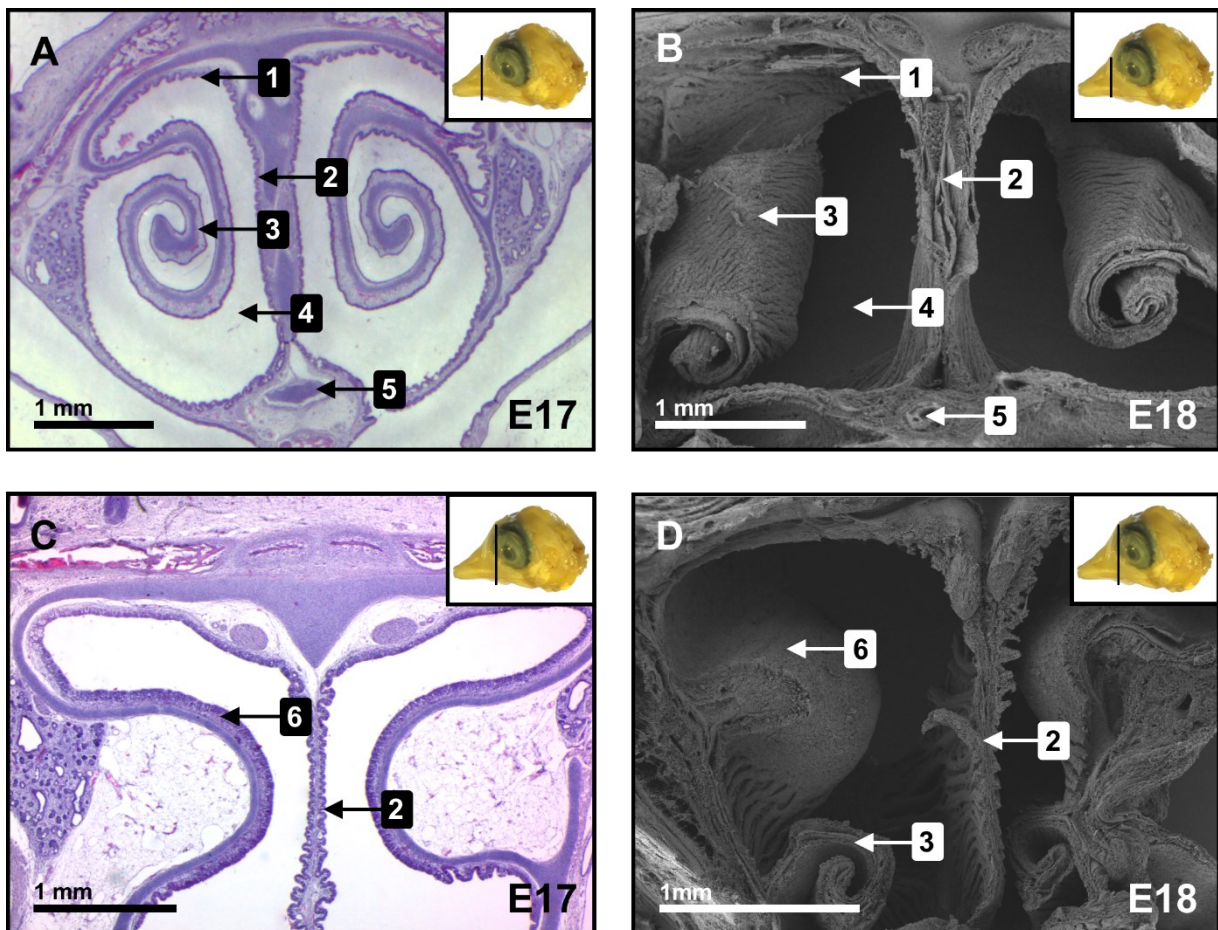


Abbildung 4: REM/H&E Färbung - Koronarschnitte durch die Concha nasalis media et caudalis

Die Abbildung 4 zeigt einen direkten Vergleich zwischen Koronarschnitten der Nasenhöhle auf Höhe der Concha nasalis media (Bild A und B) und durch die Concha nasalis caudalis (Bild C und D) mit den Methoden der H&E Färbung und der REM in den Stadien E17 und E18. Die Bilder A und C sind Paraffinschnitte mit einer H&E Färbung. Die Bilder B und D sind REM Aufnahmen. (1) Nasenhöhlendach, (2) Septum nasi, (3) Concha nasalis media, (4) Cavum nasi proprium, (5) Vomer, (6) Concha nasalis caudalis. Quelle: eigene Darstellung

Die Concha nasalis media (Bild A, B und D, 1) ist ausgekleidet mit respiratorischem Epithel und enthält, wie die Concha nasalis rostralis, eine Knorpellamelle. Sie befindet sich zwischen der Concha nasalis rostralis und der Concha nasalis caudalis (Bild C und D, 5) (Vollmerhaus et al. 2004, S. 160). Die Concha nasalis media entspringt von der lateralen Wand der Nasenhaupthöhle (Bild A bis D, 3) und stülpt sich nach medial in Richtung Nasenseptum (Bild A bis D, 2) ein (Casteleyn et al. 2018). Auf Höhe der Nasenhaupthöhle ist das Nasenseptum ebenfalls mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Die Concha nasalis caudalis befindet sich hinter (kaudal) der Concha nasalis media und ist eine Knorpelblase, welche sich von lateral in Richtung Nasenseptum einstülpt. Auf Ihrer Oberfläche trägt sie olfaktorische Schleimhaut (Gomez und Celii 2008; Hogan et al. 2020). Unterhalb der Concha nasalis caudalis existiert eine Verbindung zum Sinus infraorbitalis (Vollmerhaus et al. 2004, S. 161).

1.3 Histologie des respiratorischen Epithels

Der anatomische Aufbau des respiratorischen Epithels variiert mit der Lokalisation im Respirationstrakt. Im oberen Respirationstrakt ist das respiratorische Flimmerepithel überwiegend mehrreihig und besteht aus mehreren Zelltypen. Dazu zählen hochprismatische Flimmerepithelzellen, schleimproduzierende Zellen (Goblet-Zellen), Basalzellen, neuroendokrine Zellen und Zellen mit chemosensorischer Funktion (Brush cells, Tuft cells) (Krstic 1991; Vollmerhaus et al. 2004; Lüllmann-Rauch 2009; Hogan und Tata 2019). Die Flimmerepithelzellen stellen den größten Teil des Epithels dar und tragen auf ihrer Oberfläche Kinozilien. Goblet Zellen sind schleimproduzierende Zellen, welche sich zwischen den Flimmerepithelzellen befinden. Sie sind lichtmikroskopisch an den charakteristischen Muzin-Granula erkennbar, welche sich im apikalen Zytoplasma befinden. Die vorherrschend produzierten Muzine im Respirationstrakt sind nach heutigem Kenntnisstand MUC5AC und MUCB5 (Okuda et al. 2019). Goblet Zellen erstrecken sich über die gesamte Höhe des Epithels, haben ein charakteristisch kelchförmiges Aussehen (Kelch = engl. goblet) und einen basal gelegenen Nucleus. Bei chronischen Erkrankungen, wie bei der COPD und dem Asthma bronchiale, konnten FOXA3 induzierte Metaplasien der Goblet Zellen nachgewiesen werden (Chen et al. 2014). Basalzellen liegen direkt der Basalmembran an, erreichen nicht die Zelloberfläche und fungieren als multipotente Stammzellen für die anderen Zelltypen im respiratorischen Epithel (Rock et al. 2009). Vereinzelt können im respiratorischen Epithel der Nasenschleimhaut auch Zellen mit chemosensorischer Funktion nachgewiesen werden, z.B. Bürstenzellen (engl. Brush cells) oder auch Büschelzellen (engl. Tuft cells). Ihre Funktion ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Nach heutigem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass sie Geschmacksrezeptoren exprimieren, welche unter anderem Bitterstoffe detektieren können, die mit bakteriellen Infektionen des oberen Respirationstraktes in Verbindung gebracht werden (Lee et al. 2012; Saunders et al. 2013; Ting und Moltke 2019).

1.4 Morphologie und Physiologie der Zilien

Zilien sind Mikrotubuli enthaltende Zellfortsätze, welche sich von einem Basalkörper ausgehend über die Zelloberfläche erheben und durch eine spezielle Membran begrenzt sind (Satir und Christensen 2007; Pedersen et al. 2012). Im adulten Organismus existieren mehrere Typen von Zilien, die aufgrund verschiedener Kriterien klassifiziert werden können. Anhand der Binnenarchitektur und der Möglichkeit zur Eigenbewegung (Motilität) werden motile Zilien, Primärzilien und Hybrid-Zilien unterschieden. Zilien lassen sich in verschiedene Abschnitte untergliedern. Dazu zählen der Basalkörper, die Transitionszone, das Axonem, die Zilienmembran und die Zilienspitze (Abbildung 5, Bild A).

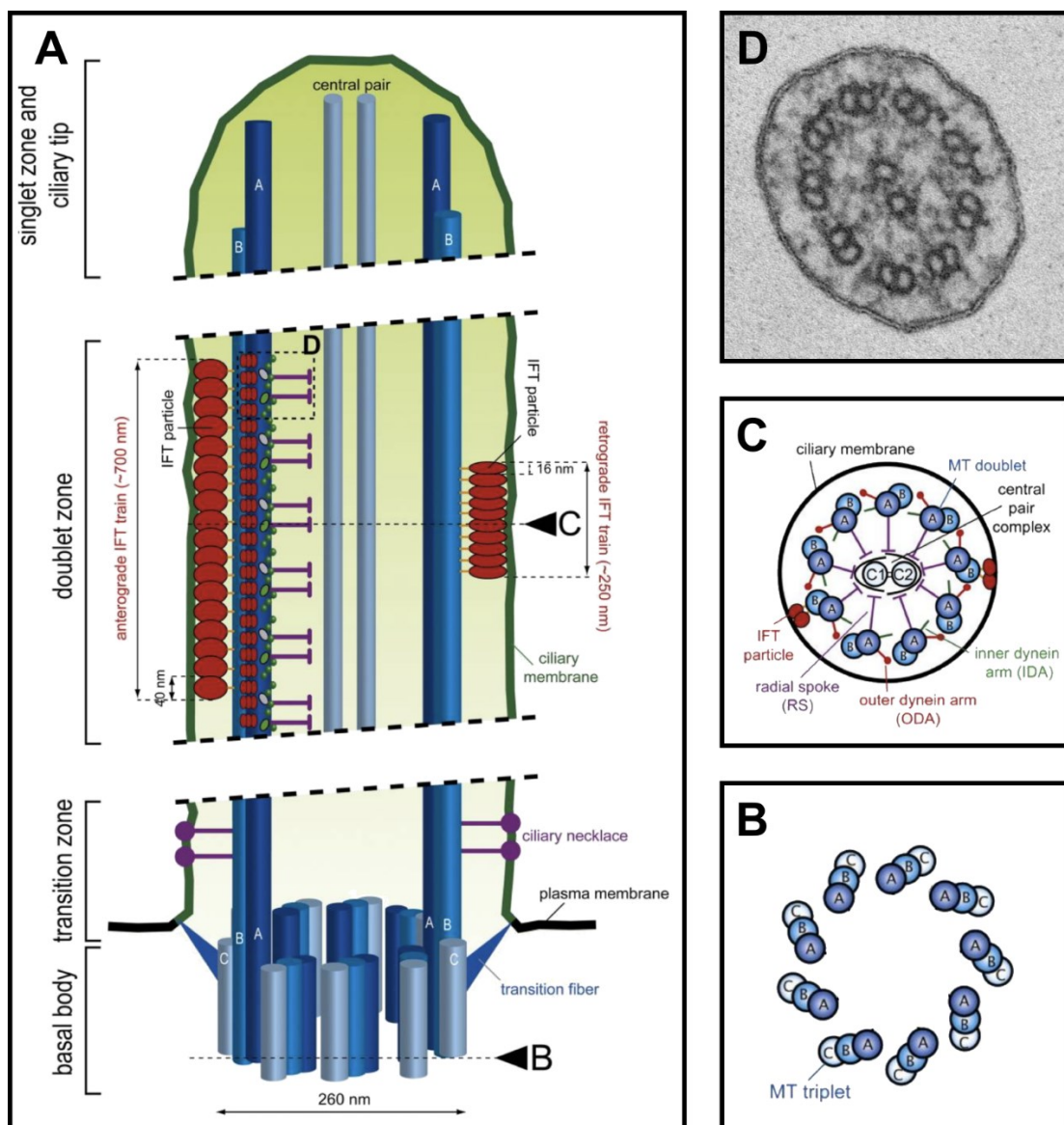


Abbildung 5: Aufbau von motilen Zilien im Längs- und Querschnitt
 Im Bild A ist ein schematischer Aufbau eines motilen Ziliums dargestellt. Das Bild B demonstriert einen proximalen Querschnitt durch den Basalkörper (9-Mikrotubuli Triplets). Die Bilder C und D zeigen den Querschnitt durch das motile Zilium mit der typischen 9 + 2-Struktur. Bild D ist eine TEM Aufnahme durch ein motiles Zilium des embryonalen respiratorischen Epithels der Trachea. Quelle Bild A, B und C: modifiziert nach (Mizuno et al. 2012), Bild D: institutsinterne TEM Aufnahme aus (Reinke 2022).

Einleitung

Am distalen Ende befinden sich zwei Typen von Anhängseln (engl. *appendages*). Aus dem distalen Anhängsel (engl. *distal appendage*) werden die Transitionsfasern des Basalkörpers gebildet (Abbildung 6, Bild A). Sie dienen der Verankerung des Basalkörpers mit der Zellmembran. Aus dem subdistalen Anhängsel (engl. *subdistal appendage*) entsteht der basale Fuß (engl. *basal foot*). Bei motilen Zilien besteht die Besonderheit, dass sie nur einen großen basalen Fuß ausbilden, welcher in Schlagrichtung ausgerichtet ist (Abbildung 6, Bild A und Abbildung 8, Bild A, 2). Während des Andockens des Basalkörpers an der Zellmembran, spielt die Ausrichtung des basalen Fußes eine entscheidende Rolle, weil der basale Fuß ebenfalls als Mikrotubuli-Organisationszentrum fungiert und damit die spätere Schlagrichtung des Ziliums bestimmt (Kunimoto et al. 2012).

Primärzilien besitzen mehrere basale Füße (engl. *basal feet*), welche auch in ihrem Aufbau komplexer sind, als bei den motilen Zilien (Soares et al. 2019).

Die Transitionszone besteht aus Y-förmigen Verbindungen zwischen den Mikrotubuli-Doubletts des Axonema und der Zilienmembran in diesem Bereich (Abbildung 6, Bild A und Abbildung 7, Bild A, 3). Sie kontrolliert die Ein- und Ausfuhr von membranassoziierten Proteinen aus dem Zilium und somit auch die Zusammensetzung der ziliären Membran (Emmer et al. 2010; Gonçalves und Pelletier 2017; Garcia et al. 2018; Greenan et al. 2020).

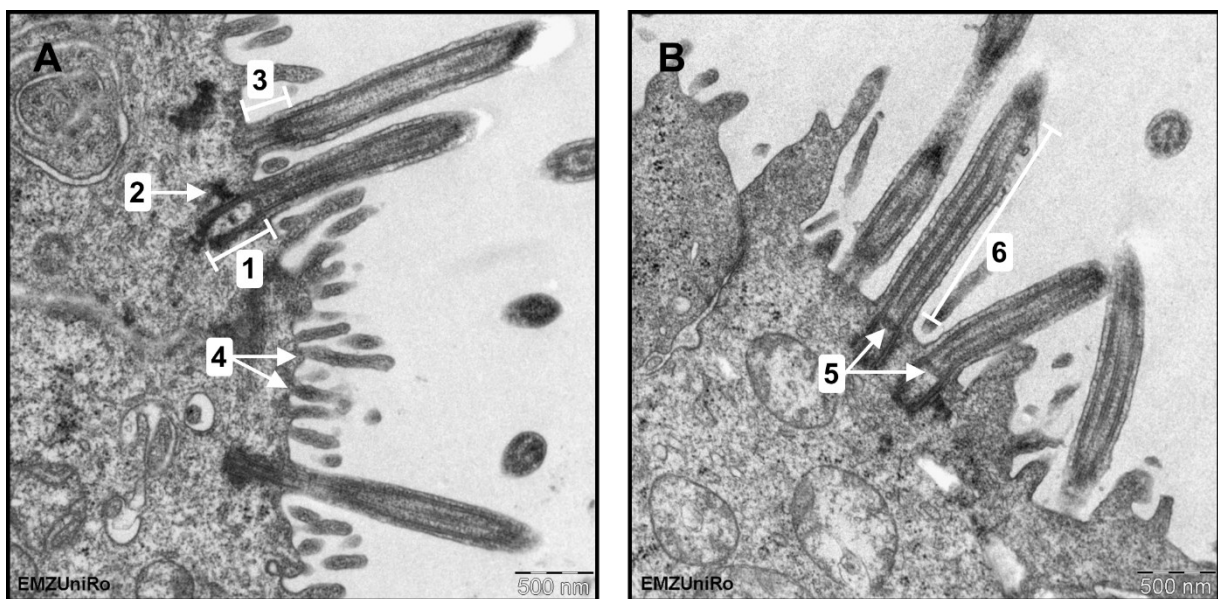


Abbildung 7: TEM - motile Zilien im Längsschnitt

In der Abbildung 7 sind TEM Bilder von embryonalen respiratorischen Epithelzellen der Trachea dargestellt. An der Oberfläche finden sich zahlreiche Mikrovilli und Zilien im Längsschnitt. (1) Basalkörper, (2) subdistales Anhängsel des Basalkörpers, in motilen Zilien besteht die Besonderheit, dass sie nur einen großen basalen Fuß (engl. *basal foot*) ausbilden, (3) Transitionszone eines motilen Ziliums, (4) Mikrovilli, erkennbar an dem fehlenden Basalkörper und dem fehlenden Axonema, (5) die Basalplatte (engl. *basal plate*) stellt den Beginn des zentralen Tubulus Paares des Axonema dar, (6) Axonema eines motilen Ziliums mit der 9 + 2-Struktur. Quelle: institutsinterne Bilder des EMZ Rostock von A. Reinke aus der Arbeitsgruppe unter Leitung von PD Dr. sc. nat. Markus Frank.

1.4.2 Binnenarchitektur der Zilien

Im folgenden Kapitel wird die Binnenarchitektur der Zilien näher erläutert. Die Binnenarchitektur der motilen Zilien unterscheidet sich von den Primärzilien. Das Axonema der motilen Zilien besteht aus der 9 + 2-Struktur (9 Mikrotubuli Doublets und in der Mitte 2 Einzeltubuli) (Abbildung 5, Bild C und D). Jedes Mikrotubuli Doublet setzt sich aus einem kompletten A-Tubulus und einem inkompletten B-Tubulus zusammen. Komplette A-Tubuli bestehen aus 13 Protofilamenten, inkomplette B-Tubuli aus 10 Protofilamenten. Als Bausteine für die Protofilamente dienen das alpha- und das beta-Tubulin. Am dem jeweiligen A-Tubulus der Mikrotubuli-Doublets befindet sich das Motorprotein Dynein, welches für die Schlagbewegungen der Zilien verantwortlich ist. Radialspeichen (engl. *radial spoke*) verbinden die Mikrotubuli-Doublets mit den zentralen zwei Mikrotubuli (Lüllmann-Rauch 2009; Fisch und Dupuis-Williams 2011; Ishikawa 2017; Ma et al. 2019). Das Axonema der Primärzilien besteht aus 9 Mikrotubuli Doublets (9 + 0 Struktur). Im Vergleich zu den motilen Zilien fehlen diesen Primärzilien im Zentrum zwei Einzeltubuli und die Dynein-Arme. Obwohl Primärzilien seit langem Gegenstand der Forschung sind, ist bis heute die Binnenstruktur noch nicht abschließend geklärt. In neusten Studien konnte gezeigt werden, dass die klassische 9 + 0 Struktur nur an der Zilienbasis vorkommt und weiter apikal nicht mehr vorhanden ist. Dort findet sich vielmehr ein unstrukturiertes Bündel von Mikrotubuli und Aktinfilamenten (Sun et al. 2019; Kiesel et al. 2020). Erkenntnisse im Bereich des adulten respiratorischen Epithels zeigen sogar die Existenz von „Hybrid Zilien“ auf, welche sowohl Eigenschaften von Primärzilien als auch von motilen Zilien aufweisen. Hybrid Zilien besitzen einen Basalkörper, welcher mehrere Fortsätze ausbildet (engl. *basal feet*) als der Basalkörper von motilen Zilien und somit dem von Primärzilien ähnelt. Die Binnenarchitektur allerdings scheint der von motilen Zilien zu entsprechen (Liu et al. 2020).

1.4.3 Zilienmembran und Zilienspitze

Der oberste Teil des Ziliums wird Zilienspitze (*Zilienapex*) genannt. In der Zilienspitze werden Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli auf- und abgebaut und somit die Länge der Zilien, mit Hilfe des intraflagellaren Transportes (IFT), reguliert (Marshall und Rosenbaum 2001). Das Motorprotein Kinesin-2, welches IFT-Partikel anterograd transportiert, wird in der Zilienspitze inaktiviert (Abbildung 5, Bild A). Das, für den retrograden Transport von IFT Partikeln zuständige Dynein-2, wird aktiviert (Pedersen et al. 2012). Der Aufbau des Zilienapex variiert zwischen unterschiedlichen Organismen. Bei den motilen Zilien kommt häufig eine zentrale Kappe vor, welche aus einer membranumhüllten Struktur besteht, die über zwei Platten mit den zentralen Mikrotubuli-Doublets verbunden ist (Fisch und Dupuis-Williams 2011).

Alle Zilienarten sind von einer spezifischen Membran umgeben, welche sich in der Zusammensetzung von der Zellmembran unterscheidet. Die Zilienmembran besitzt eine höhere Konzentration an Glykolipiden und Sphingolipiden, sowie nach Art des Ziliums auch spezifische

Einleitung

Membranproteine für den Mechanismus der Signaltransduktion (Emmer et al. 2010). Diese Spezialisierung stellt eine einzigartige Herausforderung für die Zelle dar, weil die Zilienmembran, im Gegensatz zu anderen membrangebundenen Organellen, direkt an die Plasmamembran angrenzt. Aufgrund der Lateraldiffusion von Proteinen und Phospholipiden in der Zellmembran, muss die Zilienmembran von dieser räumlich abgegrenzt sein, damit wichtige Proteine in der Zilienmembran verweilen. Die Barriere zwischen der Zellmembran und der Zilienmembran wird, wie oben beschrieben, durch die Transitionszone und die Transitionsfasern gebildet (Emmer et al. 2010; Gonçalves und Pelletier 2017; Garcia et al. 2018).

In der Abbildung 8 ist exemplarisch eine multiziliäre Zelle der Concha nasalis media des Stadiums E15 mit Vergrößerungen (Vergr.) von 20.000x und 40.000x dargestellt. Die Zilienspitze und die Zilienmembran wurden mit einem Pfeil markiert.

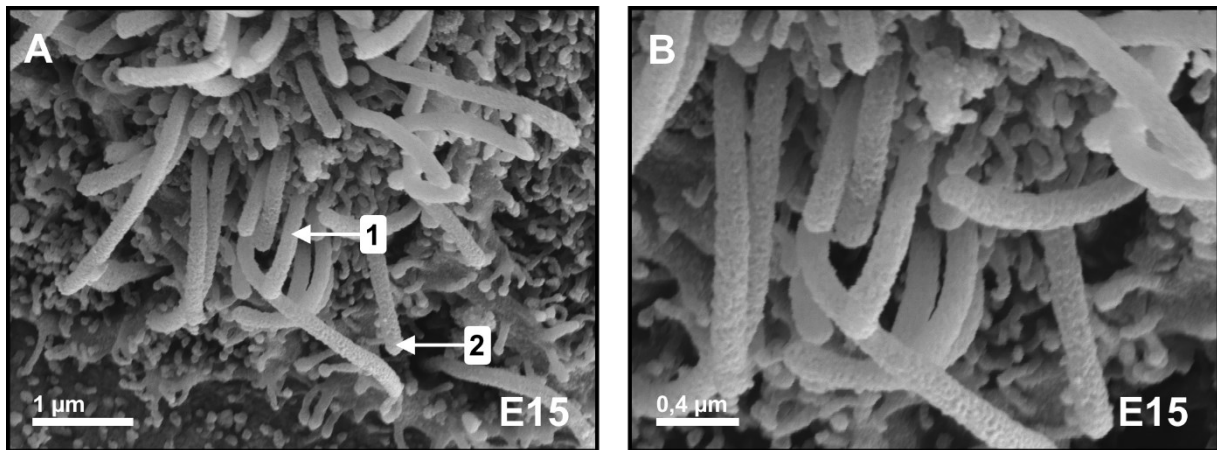


Abbildung 8: REM - Multiziliäre Zelle - E15

In der Abbildung 8 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der Concha nasalis media des embryonalen Entwicklungstages 15 dargestellt. Bild B ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Bild A und erlaubt eine Beurteilung der Zilienspitze. **(1)** Pfeil zeigt auf die Zilienmembran, **(2)** Pfeil markiert die Zilienspitze. Die Goldkörnigkeit ist an der Zilienoberfläche sichtbar (durch Besputterung mit Goldpartikeln). An der Oberfläche der multiziliären Zelle sind zahlreiche Mikrovilli zu erkennen. **(A)** Vergr. 20.000 fach, **(B)** Vergr. 40.000 fach. Quelle: eigene Darstellung

1.5 Ziliogenese

Die Ziliogenese ist ein komplexer Prozess mit mehreren Stufen und beschreibt die Bildung von Zilien oder Flagellen (Zhao et al. 2022). In der Literatur existieren unterschiedliche Einteilungen der einzelnen Prozesse der Ziliogenese. Zwischen der Ziliogenese von Primärzilien und motilen Zilien existieren Unterschiede.

1.5.1 Phasen der Ziliogenese

In diesem Kapitel werden die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur bezüglich der Ziliogenese von motilen Zilien in multiziliären Zellen zusammengefasst. Die Ziliogenese kann in mehrere Phasen/Prozesse eingeteilt werden (Garcia et al. 2018). In der ersten Phase kommt es zur massenhaften Bildung von Zentriolen innerhalb der Zelle. Die zweite Phase ist charakterisiert durch die Modifizierung und Reifung der gebildeten Zentriolen sowie deren Migration in Richtung der apikalen Zellmembran (Sullenberger et al. 2020). Das Andocken der Zentriolen an die Plasmamembran wird als dritte Phase bezeichnet (Brooks und Wallingford 2014). Die angedockten Zentriolen bilden nun die Basalkörper. In der letzten Phase werden die Zilien aus dem distalen Ende des Basalkörpers durch die Formierung des Axonema, welches von einer Zilienmembran umhüllt ist, gebildet (Avasthi und Marshall 2012; Zhao et al. 2022). Alle Phasen der Ziliogenese sind bis heute nicht vollständig verstanden und die Erkenntnisse unterliegen einem stetigen Wandel. In den folgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Möglichkeiten, in der ersten Phase der Ziliogenese, zur Bildung von Zentriolen in multiziliären Zellen (engl. *multiciliated cells*) beschrieben. Für die Entstehung eines Ziliums ist stets ein Basalkörper notwendig. Als Basalkörper wird eine Zentriole definiert, die von dem Ort ihrer Entstehung in der Perizentriolären Materialwolke (PCM) (engl. *pericentriolar material cloud*) der Zelle unter die Plasmamembran wandert, sich dort verankert und die Ausbildung eines Ziliums induziert (Marshall 2008; Lüllmann-Rauch 2009). In multiziliären Zellen besteht die Besonderheit, dass in kürzester Zeit bis zu mehrere hundert Zentriolen gebildet werden müssen (Meunier und Azimzadeh 2016). Die gebildeten Prozentriolen durchlaufen während ihrer Wanderung zur apikalen Zytoplasmamembran eine Reifung und werden, nach dem Andocken, zum Basalkörper (Breslow und Holland 2019). Die Bildung von Zentriolen in multiziliären Zellen ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Es existieren in der Literatur unterschiedliche Theorien, wie es zur Ausbildung und Vermehrung dieser großen Anzahl multipler Zentriolen pro Zelle kommt (Takumi und Kitagawa 2022). Der erste Weg beinhaltet die Bildung von Zentriolen (Prozentriolen) über die Duplikation aus einer bereits vorhandenen Zentriole an ihrem proximalem Ende (Mutterzentriole = engl. *parental centriole*) (Nanjundappa et al. 2019). Dieser Weg wird in der Literatur auch als zentriolen-abhängiger Weg (engl. *centriole-dependent-pathway*) beschrieben. So können multiziliäre Zellen, im Gegensatz zu anderen somatischen Zellen, im Rahmen der Ziliogenese aus einer Mutterzentriole, mehrere Prozentriolen bilden (Nigg und

Einleitung

Holland 2018). Eine zweite Möglichkeit der Bildung von Zentriolen erfolgt über Deuteriosomen. Die Herkunft und Funktion von Deuteriosomen werden weiterhin kontrovers diskutiert. Deuteriosomen stellen sich elektronenmikroskopisch als ringförmige, elektronendichte Strukturen dar und können eine große Anzahl von Zentriolen bilden (Takumi und Kitagawa 2022). Zentriolen (Prozentriolen) wachsen auf der Oberfläche von Deuteriosomen (Abbildung 9, Bild A, 1) und werden, wenn sie ihre korrekte Länge erreicht haben, in das Zytoplasma freigesetzt (Breslow und Holland 2019). Neueste Studien konnte zeigen, dass Deuteriosomen sich zwar in der Nähe von Zentrosomen aufhalten, allerdings nicht auf bereits vorhandene Zentriolen angewiesen sind (Zhao et al. 2019). Eine dritte Möglichkeit der Bildung von Zentriolen wird als *de novo* Synthese bezeichnet. Nach neusten Erkenntnissen ist dieser Syntheseweg wahrscheinlich unabhängig von den oben genannten beiden Synthesewegen (Takumi und Kitagawa 2022). In der PCM Cloud konnte, nach Ausschaltung beider bekannter Wege (zentriolenabhängiger Weg und Deuteriosomenweg), eine Zentriolenproduktion in der Nähe von FGMs (engl. *fibrogranular materials*) nachgewiesen werden (Mercey et al. 2019). Welcher Weg allerdings den größeren Anteil an der Synthese von Zentriolen in multiziliären Zellen hat, ist kontrovers. So gelang es Arbeitsgruppen unter bestimmten Bedingungen nachzuweisen, dass die Anzahl an Zilien an der Oberfläche sich nicht verringert, selbst wenn einer oder beide der bekannten Bildungswege der Zentriolen künstlich ausgeschaltet werden (Azimzadeh et al. 2012; Mercey et al. 2019).

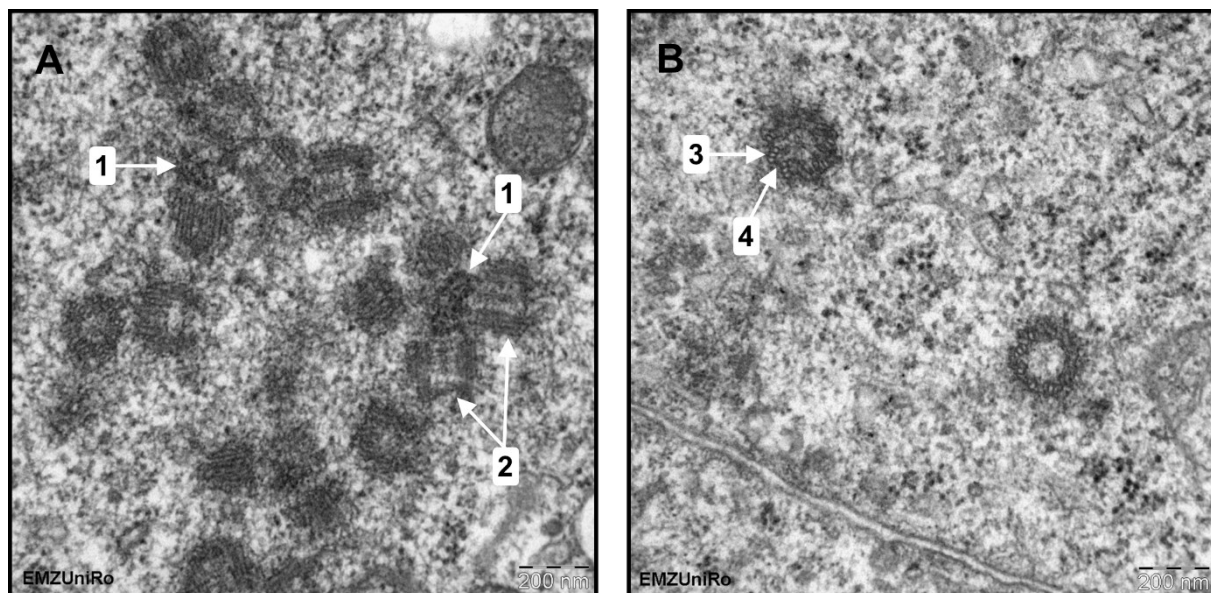


Abbildung 9: TEM - Deuteriosomen und Prozentriolen

In der Abbildung 9 sind TEM Bilder von embryonalen respiratorischen Epithelzellen der Trachea dargestellt. Im Bild A sind mehrere Deuteriosomen erkennbar, sowie in näherer Umgebung gebildete Prozentriolen. Das Bild B zeigt zwei Zentriolen im Querschnitt durch das proximale Ende. (1) Deuteriosomen, (2) Prozentriolen in der Nähe der Deuteriosomen (3) Typischer Aufbau der Zentriolen (9-Mikrotubuli Tripletts), (4) AC-Linker zwischen den Mikrotubuli-Tripletts. Quelle: Bilder von A. Reinke aus der Arbeitsgruppe unter Leitung von PD Dr. sc. nat. M. Frank (EMZ)

1.5.2 Modell der Ziliogenese im respiratorischen Epithel

Im folgenden Kapitel wird auf das von Jain et al. entwickelte Modell zur Entstehung der Zilien auf einer respiratorischen Flimmerepithelzelle genauer eingegangen (Jain et al. 2010). Dieses Modell bezieht sich hauptsächlich auf die Forschung an Zellkulturen mit humanen- und Maus-Epithelzellen der Trachea. In dieser Arbeit wird beschrieben, dass im Verlauf der Zelldifferenzierung einer einzelnen Epithelzelle sowohl Primärzilien als auch motile Zilien auf der Oberfläche ausgebildet werden. Nach diesem Modell durchläuft eine Epithelzelle, in Bezug auf die Ausprägung von Zilien auf ihrer Oberfläche, in ihrer Entwicklung eine Transformation. Die Entwicklung beginnt mit einer Vorläuferepithelzelle, welche auf ihrer Oberfläche ein einzelnes Primärzilium ausbildet. Aus dieser Vorläuferepithelzelle entwickelt sich im Verlauf, unter Expression des *Foxj1*-Gens, eine multiziliäre Flimmerepithelzelle. Mit Expression des *Foxj1*-Gens kommt es zur Rückbildung des Primärziliums und dem Andocken von multiplen Basalkörpern an der apikalen Zellmembran. Nach Resorption des Primärziliums existiert, vor Ausbildung der motilen Zilien auf der Oberfläche, eine kurze Zwischenphase ohne einen Besatz mit Zilien. Im Prozess der weiteren Differenzierung wandelt sich die einzelne Zelle zu einer multiziliären Zelle, mit Ausbildung von motilen Zilien auf ihrer Oberfläche, um. Diese Transformation ist in der Abbildung 10 schematisch dargestellt.

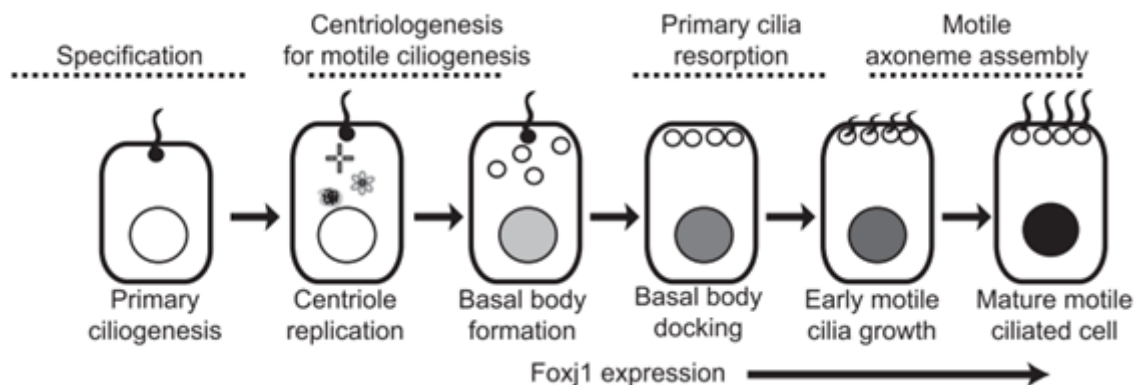


Abbildung 10: Modell der Differenzierung einer embryonalen respiratorischen Epithelzelle
In der Abbildung 10 ist ein Modell der schematischen Entwicklung einer embryonalen Progenitorzelle bis zu einer respiratorischen Flimmerepithelzelle dargestellt. Quelle: modifiziert nach (Jain et al. 2010)

1.6 Ziliopathien

Ziliopathien sind hereditäre Erkrankungen, welche durch eine gestörte Zilienfunktion gekennzeichnet sind (Zerres 2010; Hildebrandt et al. 2011; Kim und Kim 2019). Sie sind Funktionsstörungen der Primärzilien oder motilen Zilien. Die Tabelle listet einige bekannte Ziliopathien auf (Hildebrandt et al. 2011; Ahrens 2012; Boon et al. 2014; Damseh et al. 2017).

Ziliopathien der Primärzilien	Ziliopathien der motilen Zilien
Usher-Syndrom (USH)	Primäre Ziliäre Dyskinesie (PCD)
Bardet-Biedl-Syndrom (BBS)	Reduced Generation of Multiple Motile Cilia (RGMC)
Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)	
Polyzystische Nierenerkrankung (PKD)	
Oro-fazio-digitales-Syndrom (OFD)	
Joubert-Syndrom (JBTS)	

Tabelle 1: Übersicht einiger Ziliopathien

Aufgrund der Tatsache, dass sich Zilien in vielen verschiedenen Organsystemen befinden, ist auch die klinische Ausprägung dieser Erkrankungsgruppe sehr variabel. In der Abbildung 11 sind einige Symptome und Erkrankungen von Ziliopathien nach Organsystemen geordnet.

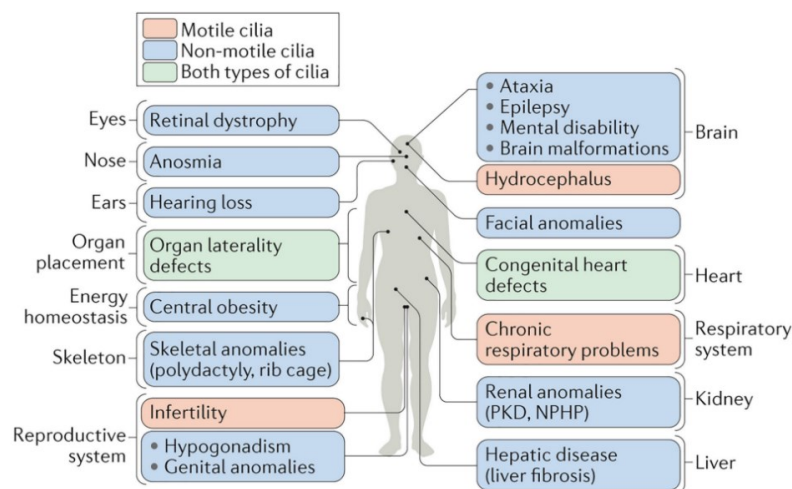


Abbildung 11: Klinische Symptome und Erkrankungen bei Ziliopathien

Die Abbildung 11 demonstriert eine Auswahl von möglichen Organsystemen, mit den jeweiligen Erkrankungen und Symptomen, welche bei Ziliopathien betroffen sein können. Zusätzlich erfolgt eine Unterscheidung, ob es sich um eine Erkrankung der Primärzilien oder der motilen Zilien handelt. Quelle: (Reiter und Leroux 2017)

Zu den klinischen Manifestationen zählen unter anderem Anosmie, chronische Sinusitis, kongenitale Schallempfindungsschwerhörigkeit, Zystennieren, Retinale Dystrophien, Situs inversus, mentale Retardierung und Infertilität (Hildebrandt et al. 2011; Reiter und Leroux 2017).

Die Verdachtsdiagnose einer Ziliopathie wird häufig durch eine interdisziplinäre Zusammenarbeit vieler medizinischer Fachbereiche gestellt (Gerth-Kahlert und Koller 2018). Für die Diagnostik stehen unter anderem Gen Panels zur Verfügung, welche mittels Next-Generation Sequencing das Vorliegen von Gendefekten, die mit Ziliopathien assoziiert sind, nachweisen. Diese spezifischen Gendefekte sind Gegenstand aktueller Forschung, wie zum Beispiel im 100,000 Genome Project (Whewey und Mitchison 2019).

In dieser Dissertation liegt der Fokus auf der Nasenhöhle, mit dem respiratorischen Epithel der Conchae nasales. Die Besonderheit in der Nasenhöhle ist das Vorkommen von Primärzilien und motilen Zilien in enger räumlicher Umgebung zueinander. Aus hereditären Defekten von motilen Zilien, im Bereich des respiratorischen Epithels des oberen Respirationstraktes, resultieren häufig kongenitale chronisch respiratorische Probleme, wie zum Beispiel die chronische Rhinosinusitis (Damseh et al. 2017). Eine fehlende, oder eingeschränkte Funktion der Primärzilien des olfaktorischen Epithels, resultiert klinisch in einer Hyp/Anosmie (Kulaga et al. 2004). Exemplarisch werden im Folgenden das Bardet-Biedl Syndrom und die Gruppe von Erkrankungen im Rahmen der Primären Ziliären Dyskinesie, bei denen die Funktion von Zilien im Bereich der Nasenhöhle eingeschränkt ist, vorgestellt.

1.6.1 Bardet-Biedl-Syndrom

Ein Vertreter aus der Gruppe von Ziliopathien mit defekten Primärzilien ist das vorwiegend autosomal rezessiv vererbte BBS (Forsythe et al. 2018; Manara et al. 2019). Die Ätiopathogenese des BBS konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Als Ursache gelten nach heutigem Kenntnisstand Gendefekte, welche für Proteine kodieren, die im Basalkörper und der Transitionszone von Primärzilien lokalisiert sind (Priya et al. 2016; Gonçalves und Pelletier 2017; Manara et al. 2019; Klink et al. 2020). Mutationen in BBS Genen führen zu einer Störung in der Funktion der Primärzilien und der Unterbrechung von chemischen Signalwegen während der embryonalen Entwicklung (MedlinePlus 2021). Primärzilien befinden sich in vielen Organsystemen, folglich kann die klinische Symptomatik sehr variabel sein. Die klinischen Diagnosekriterien unterteilen sich in primäre und sekundäre Symptome. Zu den primären Symptomen zählen die Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, die Stammfettsucht, die Polydaktylie, genitale und renale Anomalien sowie die mentale Retardierung. Einige wichtige sekundäre Symptome sind die Anosmie, die Ataxie und die Entwicklungsverzögerung (Forsythe et al. 2018). Die Stäbchen-Zapfen Dystrophie ist ein wichtiges Symptom für die Verdachtsdiagnose eines BBS (90-100% Prävalenz). Aufgrund dieser klinischen Symptomatik erfolgt in vielen Fällen die primäre Diagnostik durch den Ophthalmologen (Forsythe et al. 2018). Der kongenitalen Anosmie

(60% Prävalenz) liegt eine gestörte Funktion der Primärzilien im olfaktorischem Epithel zugrunde (Kulaga et al. 2004; Forsyth und Gunay-Aygun 2020). Um die Verdachtsdiagnose des BBS zu bestätigen, wird zurzeit ein Gen-Panel verwendet, welches 16 bis 18 Gene (z. B. BBS-1, BBS-10) enthält. Zur erweiterten Diagnostik stehen 9 zusätzliche Gene zur Verfügung (z. B. ALMS1, CEP290) (Manara et al. 2019; Zarbock 2021).

1.6.2 Primäre Ziliäre Dyskinesie

Die PCD ist eine Multisystemerkrankung, mit einer geschätzten Inzidenz von 1 zu 10.000 bis 40.000 Lebendgeburten, welche klinisch sehr heterogene Phänotypen ausbildet (Horani et al. 2016; Damseh et al. 2017; Raidt et al. 2020).

In den letzten Jahren konnten eine Vielzahl von unterschiedlichen genetischen Defekten identifiziert werden, die eine PCD verursachen. Klinisch präsentiert sich die PCD in der Diagnostik durch einen abnorm veränderten Zilienschlag, verursacht durch Störungen in der axonemalen Struktur der motilen Zilien, oder durch eine deutlich reduzierte Anzahl der Zilien pro Zelle. Aufgrund der genotypischen Vielfalt sind somit unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung möglich (Lucas et al. 2017).

Die gestörte Funktion der motilen Zilien führt als Leitsymptom zu einer Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance und somit unter anderem zu einer persistierenden Hustenproblematik, zu chronischer Rhinosinusitis, Bronchiektasien, rezidivierenden Paukenergüssen bzw. chronischer Otitis media und zu Infertilität. Etwa drei Viertel der PCD-Neugeborenen entwickeln ein Atemnotsyndrom (Ahrens 2012; Horani und Ferkol 2016; Raidt et al. 2020).

Eine Dysfunktion von Zilien im embryonalen Knoten während der Entwicklung kann zu kongenitalen Herzerkrankungen und zu Fehlern in der Rechts-/Linksachse, wie es unter anderem beim *situs inversus* zu beobachten ist, führen. Bei PCD Patienten tritt in weniger als 50% ein *situs inversus totalis* (spiegelbildliche Anordnung der Organe im Körper) auf (Leigh et al. 2019). Die Trias aus chronischer Sinusitis, Bronchiektasien und *situs inversus totalis* wird als Kartagener Syndrom bezeichnet (Ciancio et al. 2015).

Die Diagnostik der PCD ist komplex, weil sie eine Gruppe von Erkrankungen darstellt, in der es viele genetische Ursachen und phänotypische Manifestationen gibt. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren zwei Leitlinien, eine europäische Leitlinie der *European Respiratory Society* (Lucas et al. 2017) sowie eine nordamerikanische Leitlinie (Shapiro et al. 2016), welche der Frage nach dem besten Diagnostikalgorithmus nachgegangen sind. Im folgenden Absatz wird auf die europäische Leitlinie Bezug genommen (Abbildung 12). Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine Goldstandard-Untersuchung zur alleinigen Diagnostik einer PCD. Vielmehr wird die Diagnose einer PCD durch eine Kombination aus mehreren technisch anspruchsvollen Untersuchungen gestellt. Bei einem klinischen Verdacht auf eine PCD wird derzeit als erster Schritt

Einleitung

die Messung der nasalen Stickstoffmonoxid-Konzentration (engl. *nasal nitric oxide* (nNO)) sowie einer Hochfrequenzvideomikroskopischen Analyse (engl. *high-speed video microscopy analysis* (HSVA)) empfohlen. Bei PCD-Patienten können in der nNO-Messung signifikant niedrigere Werte als in der Normalpopulation festgestellt werden. Die nNO-Messung ist allerdings nicht als alleiniges Tool zur Diagnosestellung geeignet, weil die Messung von der Analysemethode, der Probenentnahme und dem Alter des Patienten abhängig ist (Collins et al. 2014; Beydon et al. 2022). Zudem können verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel akute Sinusitiden, zu einer erniedrigten nNO-Konzentration führen, ohne dass eine PCD vorliegt (Nüßlein et al. 2013). Im ersten Schritt sollte zusätzlich zur nNO-Messung eine Hochfrequenzvideomikroskopische Analyse erfolgen. Für diese Diagnostik werden respiratorische Flimmerepithelzellen benötigt, welche aus einer nasalen Bürstenbiopsie gewonnen werden können. Die Flimmerepithelzellen werden zeitnah, bei Raumtemperatur, auf einem Objektträger aufgetragen und mittels einer digitalen Hochfrequenzmessung in ihrem Zilienschlag, sowie dem Sekrettransport, beurteilt. Wenn beide Tests, nNO-Messung und HSVA, positiv ausfallen, ist die Diagnose PCD hinreichend wahrscheinlich, sodass von zusätzlicher Diagnostik Abstand genommen werden kann.

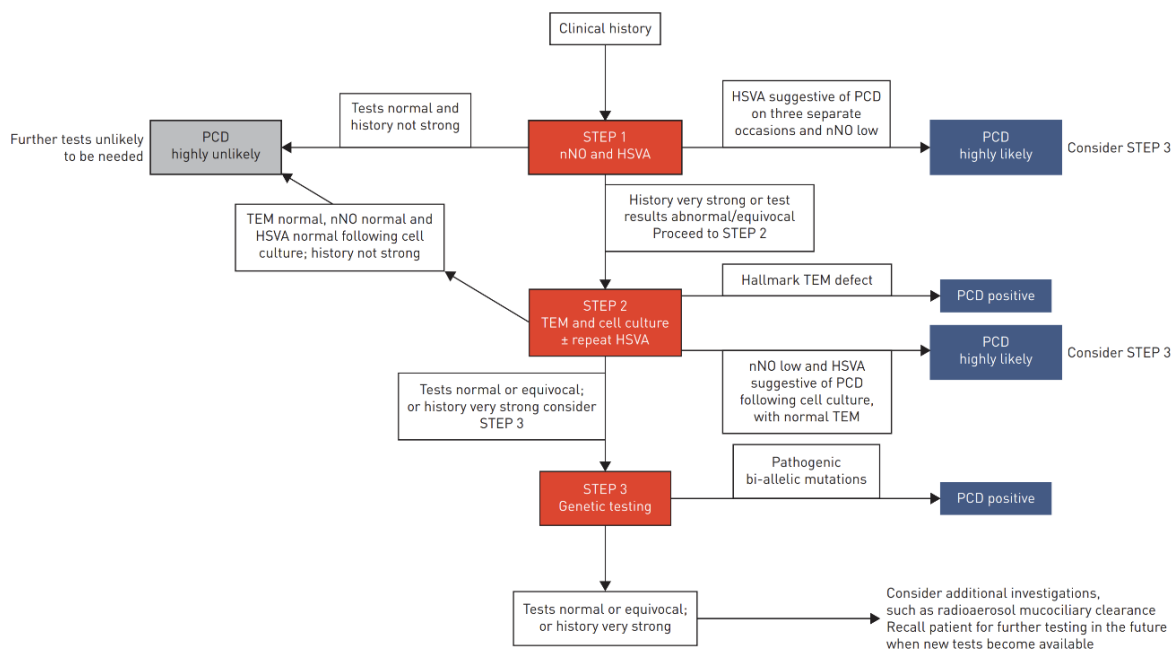


Abbildung 12: Diagnostik Algorithmus bei PCD Verdacht
Quelle: (Lucas et al. 2017)

Besteht allerdings trotz negativer/unklarer Diagnostik weiterhin ein hochgradiger klinischer Verdacht auf eine PCD, kann als zweite Stufe der Diagnostik eine Transmissionselektronenmikroskopie erfolgen. Das respiratorische Epithel wird typischerweise per Bürstenbiopsie von der Concha nasalis inferior, oder aus dem unteren Respirationstrakt während einer Bronchoskopie gewonnen. Häufig wird in der TEM das Fehlen der Dynein-Arme oder der Verlust des

Einleitung

zentralen Mikrotubuli-Doublets beschrieben. Einige PCD Patienten weisen sogar eine normale Ultrastruktur in der TEM auf. Wenn die TEM Untersuchung keine pathologischen Befunde zeigt, kann zusätzlich eine genetische Analyse mittels Gen-Panels für das Next-Generation Sequencing sowie eine Wiederholung der HSVA an Zellkulturen durchgeführt werden (Barbato et al. 2009; Ahrens 2012; Nüßlein et al. 2013; Damseh et al. 2017; Mirra et al. 2017). Eine kausale Therapie der PCD ist bis zum jetzigen Stand nicht verfügbar. Aus diesem Grund erfolgt eine symptomorientierte Behandlung in den einzelnen medizinischen Fachgebieten, idealerweise an spezialisierten PCD-Diagnostik- und Behandlungszentren. Exemplarisch werden einige Therapiemöglichkeiten bei Erkrankungen der oberen Atemwege erläutert.

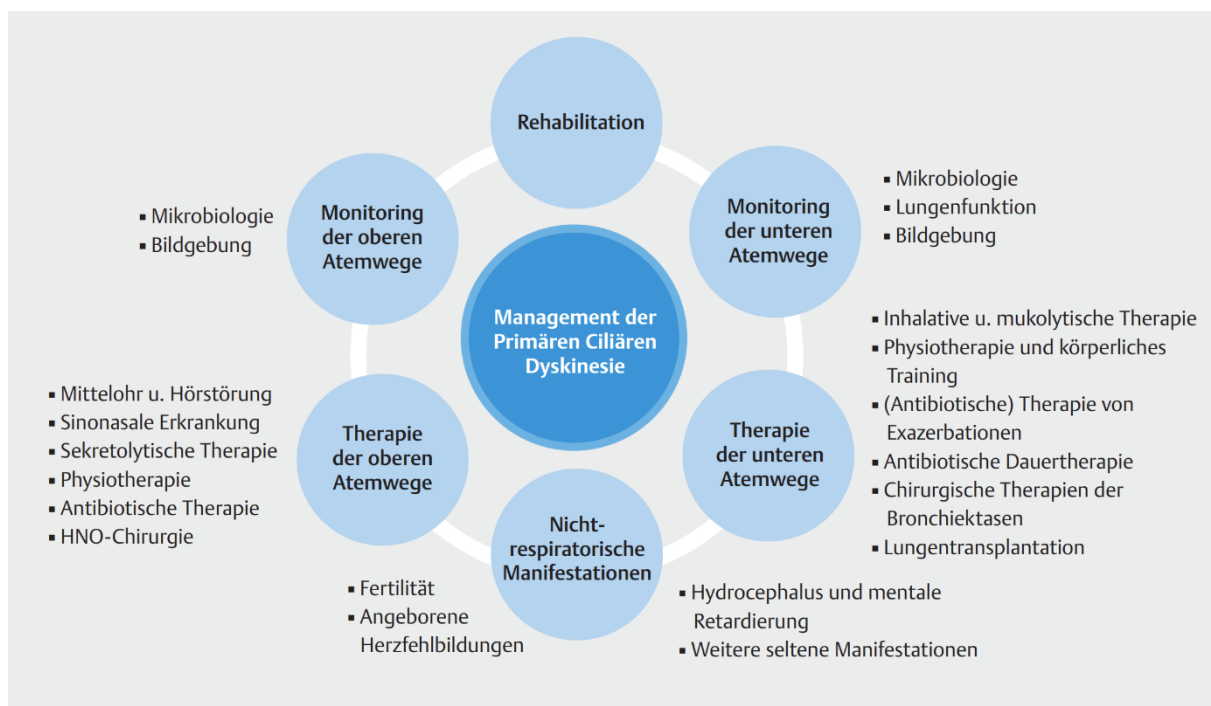


Abbildung 13: Management der Primären Ciliären Dyskinesie (PCD)
Quelle: (Raidt et al. 2020)

Die PCD Patienten mit Erkrankungen der oberen Atemwege zeigen unter anderem eine chronische Rhinosinusitis (CRS). Die Behandlung der CRS konzentriert sich auf konservative Maßnahmen, wie eine Sekretolyse durch eine regelmäßige Nasendusche bzw. Inhalation mit einer NaCl Lösung. Bei Exazerbation einer CRS kann auch eine systemische antibiotische Therapie notwendig sein. Eine Durchführung chirurgischer Maßnahmen an den Nasennebenhöhlen sollte bei PCD Patienten zurückhaltend erfolgen. So ist immer eine individuelle Indikationsstellung erforderlich. Eine Indikation zu einer operativen Therapie besteht zum Beispiel bei einer obstruierenden Polyposis (Raidt et al. 2020; Paff et al. 2021).

2. Hintergrund der Dissertation und Zielstellung

Untersuchungen zur embryonalen Entwicklung des respiratorischen Epithels mit den Methoden der Rasterelektronenmikroskopie und der Immunofärbung sind selten. Es existieren Arbeiten, welche die Entwicklung des respiratorischen Epithels an Zellkulturen, in vitro, mittels der REM und der Immunofärbung untersuchten (Jain et al. 2010). Allerdings besteht weiterhin ein hoher Bedarf an Grundlagenforschung im Bereich zilientragender embryonaler Gewebe. Mit Hilfe dieses Wissens können unter anderem neue Therapieverfahren von Ziliopathien entwickelt und getestet (Zerres 2010; Gerth-Kahlert und Koller 2018), Regenerationsprozesse nach Infektionen und Schädigungen besser verstanden (Basil et al. 2020) und Forschungen im Bereich der Therapie von Erkrankungen des zilientragenden Gewebes, wie bei der PCD, vorangetrieben werden (Paff et al. 2021). Aus diesem Grund wurden am Elektronenmikroskopischen Zentrum in Rostock verschiedene Abschnitte des Respirationstraktes am gleichen Organismus des Haushuhns, in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. In einer früheren Dissertation am EMZ (Reinke 2022) wurde das respiratorische Epithel der Trachea in Hinblick auf die zeitliche Entwicklung zilientragender Epithelzellen mittels der Methoden REM, Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Immunofluoreszenz erforscht.

Diese Dissertation beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Untersuchung der Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle am Organismus des embryonalen Haushuhns, in Hinblick auf die Ausprägung von zilientragenden Zellen im Zellverband. Es wurden vorrangig folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche embryonalen Entwicklungsstadien erlauben die umfassende Abbildung der Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle in Hinblick auf ihren Zilienbesatz? Ist dieser Entwicklungszeitraum mit den institutsinternen Ergebnissen aus der Trachea vergleichbar?
2. Läuft die Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle an unterschiedlichen Lokalisationen in Hinblick auf den zeitlichen Beginn und der Dauer gleich ab, oder existieren Unterschiede?
3. Sind die Rasterelektronenmikroskopie und die Immunfärbung mit einem Zilienmarker (Antikörper gegen acetyliertes alpha Tubulin) in der Nasenhöhle effektive Verfahren, um Zilien während der embryonalen Entwicklung sicher nachzuweisen?

Hintergrund der Dissertation und Zielstellung

4. Welche Präparationsmethode mit welcher Schnittführung produziert bei der komplexen Anatomie der Nasenhöhle reproduzierbare Schnitte, um einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Regionen in der Nasenhöhle möglich zu machen?
5. Lassen sich während der Entwicklung unterschiedliche Formen von zilientragenden Epithelzellen im Zellverband nachweisen und können diese klassifiziert werden?
6. Frühere institutsinterne Untersuchungen am Modellorganismus des Haushuhns im Bereich der Trachea zeigten eine charakteristische Entwicklung in Bezug auf den Besatz mit zilientragenden Zellen. Ist eine charakteristische Abfolge auch im Bereich der Nasenhöhle nachzuweisen?
7. Welche Formen zilientragender Epithelzellen lassen sich in welchen embryonalen Stadien nachweisen?
8. In welchem Entwicklungsstadium findet sich ein flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen im Zellverband?
9. In der Trachea konnte gezeigt werden, dass am Grund der Epithelfurchen Zellen existieren, welche keine Zilien an der Oberfläche ausbilden. Lässt sich dieses Phänomen im Bereich des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle nachweisen?

3. Materialien und Methoden

Für alle Methoden wurden SPF-Eier der Firma VALO BioMedia GmbH von der Sorte „White Leghorn“ verwendet.

3.1 Materialien

3.1.1 Technische Anlagen/Geräte

Gerät	System	Hersteller
Brutapparat	HEKA Turbo 168	HEKA-Brutgeräte, Rietberg
Färbekasten mit Deckel	Kalk-Soda-Glas mit Schnappdeckel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kritischer-Punkt-Trockner	EMITECH-K850	Quorum Technologies Ltd., United Kingdom
Kühlschrank	LIEBHERR profi line	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Axioskop 40	Zeiss GmbH, Göttingen
Lichtmikroskop Kamera	AxioCam ERc5s	Zeiss GmbH, Göttingen
Mikrotom	HYRAX M 25	Zeiss GmbH, Jena
Paraffinofen	MEMMERT	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Paraffinspender	MEDAX	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Paraffinstreckbad	Tissue Floating Bath	LABOCON, Hofheim
Pipetten	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Plattformschüttler	Heidolph Vibramax 100	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Sputter Coater	SCD 004	BAL-TEC GmbH, Schalksmühle
Tischabzug	EXPLORIS®	Köttermann GmbH, Uetze
Wärmeplatte	Slides Warmer	LABOCON, Hofheim

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten technischen Geräte mit Hersteller

Materialien und Methoden

Feldemissionsrasterelektronenmikroskop Zeiss Merlin VP compact:

Installation: Juni 2014, Auflösung: unter 1 nm, verwendeter Detektor: HE-SE2

3.1.2 Software

Betriebssysteme:	Windows 7, 10 und 11 MacOs BigSur
Grafiksoftware und Bildaufnahme:	Sketch for MacOS 69.0 AffinityFoto 1.10.4 Zen 2 (AxiocamSoftware)
Anwendungssoftware:	Microsoft Word 2022

3.1.3 Verbrauchsgüter

Deckgläser 24x60 mm	Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig
Einmal-Pasteurpipetten	Brand® GmbH + Co. KG, Wertheim
Eppendorf Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH
Falcon-Tubes (15ml und 50ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Filterpapier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gewindeflaschen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Handschuhe	AMPri Handelsgesellschaft mbH, Winsen
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig
Parafilm	Bemis Company, USA
Paraplast Plus®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Ratiolab® GmbH, Dreieich
Rasierklingen	Plano GmbH, Wetzlar
Paraffinförmchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.1.4 Chemikalien

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut, unvergällt	Universität Rostock, Zentralapotheke
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhypochlorid (DanKlorix)	CP GABA GmbH, Hamburg
Ziegenserum (<i>engl. Normal Goat Serum</i>)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Paraformaldehyd Pulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Materialien und Methoden

Reinstwasser / Aqua dest.	Zentralapotheke Universität Rostock
ROTI®Histokitt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ROTI®-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween®20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 35%ig	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.5 Kits und Reagenzien

H&E Lösung 1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
H&E Lösung 2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thermo Scientific™ Pierce™ ABC-Färbe-Kit	Fisher Scientific GmbH, USA

3.1.6 Puffer und Lösungen

PFA 4%ig	Herstellung siehe Protokoll 2 im Anhang
PBS	Herstellung siehe Protokoll 1 im Anhang
10% Tween®-20	5ml Tween®-20 mit 45ml Aqua dest. mischen und kühl lagern
PBST	10ml Tween®-20 mit 990ml PBS mischen

3.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Anti-acetyliertes-Tubulin (monoklonal) (<i>engl. Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin</i>)	Acetyliertes Alpha Tubulin	Maus	1 : 2000	Sigma Aldrich Chemie GmbH, MERCK	T7451
			1 : 4000		
			1 : 8000		
			1: 10.000		
			1: 20.000		

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnr.
Anti-Maus-IgG (H+L) biotinyliert (<i>engl. Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L)</i>)	Ziege	1 : 200	Vector Laboratories, Inc., Burlingame USA	BA-9200

3.2 Methoden

In dieser Dissertation kommen die Methoden der REM, Immunofärbung mit dem Primärantikörper gegen acetyliertes alpha Tubulin (anti-ac-Tub-AK) und H&E Färbung an Paraffinschnitten zur Anwendung. In der Abbildung 14 ist schematisch der zeitliche Ablauf der verwendeten Methoden dargestellt. In den nachfolgenden Kapiteln werden die einzelnen Arbeitsschritte näher erläutert.

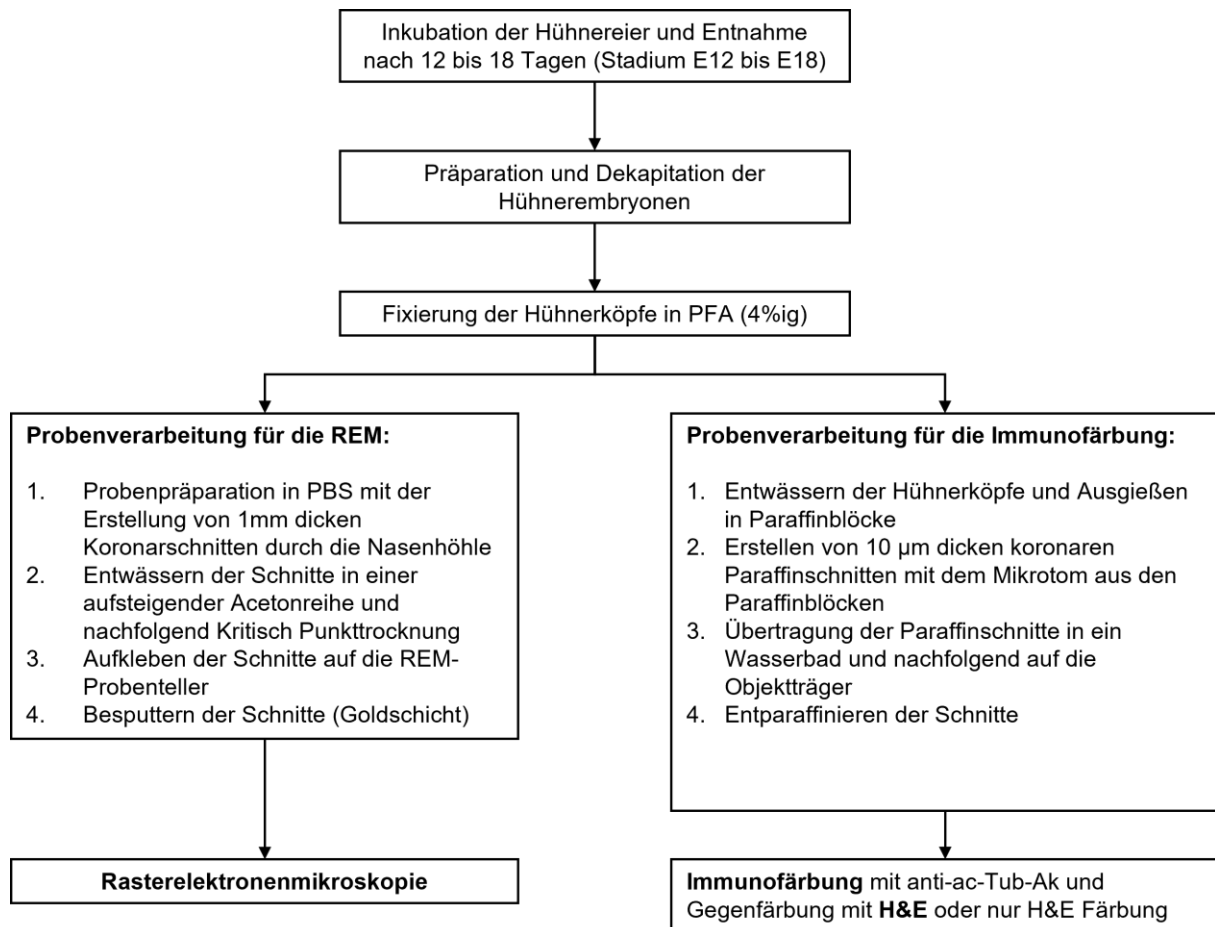


Abbildung 14: Fließschema und Überblick zu den verwendeten Methoden. Quelle: eigene Darstellung

3.2.1 Inkubation der Hühnereier und Probenverarbeitung

Die SPF Eier werden im Brutapparat inkubiert und zum gewünschten Entwicklungstag von E12 bis E18 entnommen. Der Inkubator wird mit einer Temperatur von 37,8°C, einer Luftfeuchtigkeit von ca. 60% betrieben und ist mit einer Wendeautomatik ausgestattet. An dem gewünschten Entwicklungstag werden die Eier aus dem Inkubator entnommen, auf Eis gekühlt und im Anschluss präpariert. Der aus dem Hühnerei entfernte Hühnerembryo wird mit einer Schere dekapitiert und die linke große Zehe (3. Zehe) zur Altersbestimmung vom Bein entfernt. Eine Validierung des Alters der Hühnerembryonen erfolgt durch das Ausmessen der Länge der dritten großen Zehe. Wie in der Einleitung beschrieben, existiert eine Korrelation zwischen

Materialien und Methoden

der Großzehenlänge und dem embryonalen Entwicklungstag des Hühnerembryos (Hamburger und Hamilton 1992). Um eine Autolyse der Hühnerköpfe zu verhindern, werden diese nach der Präparation vom Körperstamm direkt in Paraformaldehyd (PFA) eingelegt. Zur besseren Penetration des Fixativs erfolgte in höheren embryonalen Entwicklungsstadien (z.B. E18) zusätzlich die Abtrennung des hinteren Schädels (Abbildung 16, Bild B).

In der Abbildung 15, Bild A, ist exemplarisch ein in PFA fixierter Hühnerkopf im Stadium E13 zu sehen. Im Bild B der Abbildung 15 ist das verwendete Präparationsbesteck für die Probenverarbeitung dargestellt.

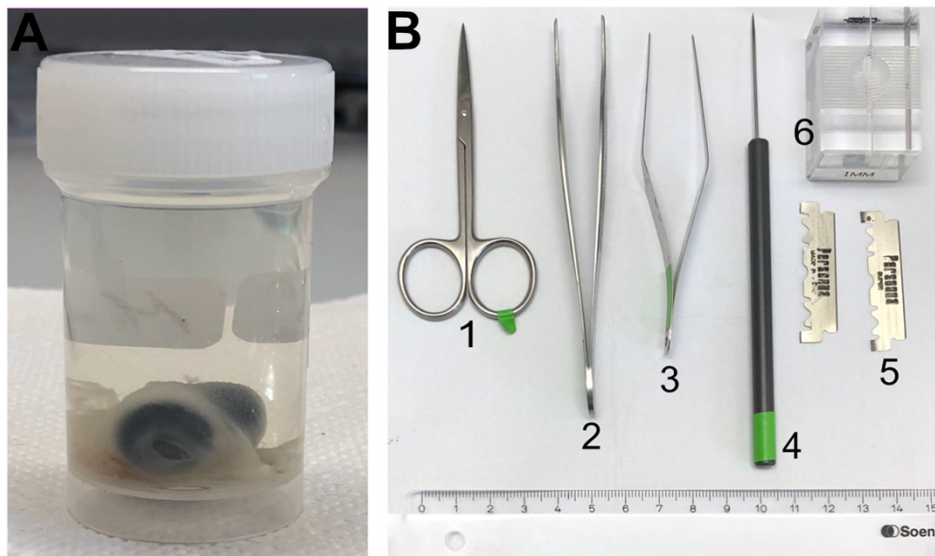


Abbildung 15: PFA fixierter Hühnerkopf im Stadium E13 und Präparierbesteck. Bild A: Hühnerkopf in PFA. Bild B: 1 = Schere, 2 und 3 = Pinzetten, 4 = Präpariernadel, 5 = Rasierklingen, 6 = Schneidematrize mit Schnittstärke 1mm. Quelle: eigene Darstellung

3.2.2 Probenverarbeitung für die Rasterelektronenmikroskopie

Um die Hühnerköpfe mit der REM untersuchen zu können, müssen die Proben zunächst, die in der Abbildung 14 beschriebenen Schritte der Probenpräparation, Entwässerung, Kritisch-Punkt-Trocknung (KPT) und Besputterung, durchlaufen. Diese sind notwendig, weil die REM Untersuchung im Hochvakuum durchgeführt wird und somit die Proben vakuumstabil und elektrisch leitfähig sein müssen.

Für die weitere Probenverarbeitung werden ausschließlich Hühnerköpfe ausgewählt, welche keine Spuren der Verunreinigung, wie zum Beispiel Einblutungen in die Conchae nasales, zeigen, weil ansonsten die Zilienoberfläche verlegt werden könnte. Im ersten Schritt werden die in PFA eingelegten Hühnerköpfe in eine Petrischale mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) übertragen. Exemplarisch sind in der Abbildung 16 zwei Hühnerköpfe in den Stadien E13 und E18 dargestellt. Die Ausdehnung der Nasenhöhle (Beginn der Concha nasalis rostralis bis Ende der Concha nasalis caudalis) ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet (\leftrightarrow). Im Stadium E13 beträgt die rostrokaudale Ausdehnung ca. 0,4 cm und im Stadium E18

Materialien und Methoden

ca. 0,9 cm. Nur in diesem Zielbereich werden Koronarschnitte angefertigt. Die Probenpräparation erfolgt mit den in der Abbildung 15 dargestellten Instrumenten.

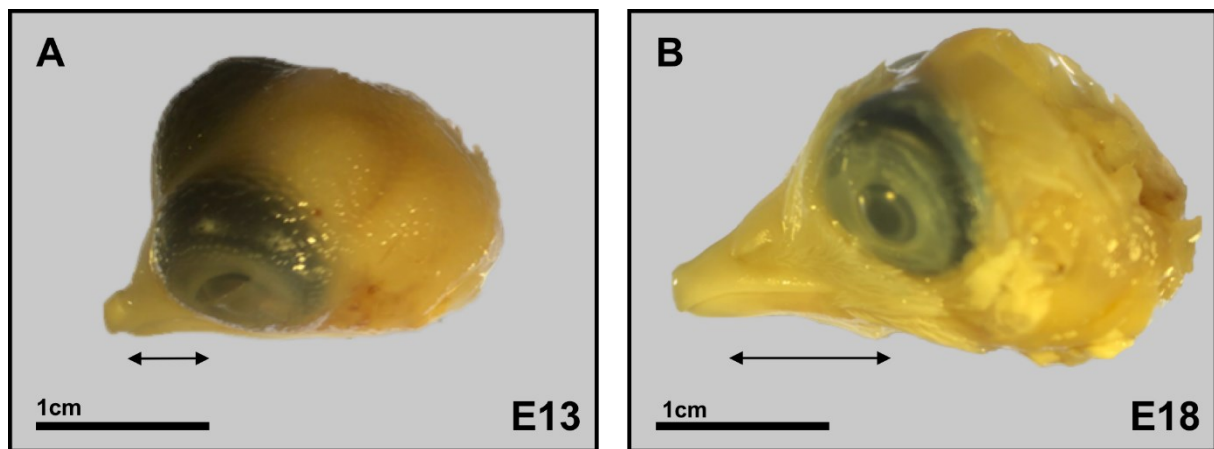


Abbildung 16: Hühnerköpfe in den Stadien E13 und E18, Bild A: Stadium E13, Bild B: Stadium E18, Doppelpfeil markiert Untersuchungsbereich in rostrokaudaler Ausdehnung. Quelle: eigene Darstellung

Unter dem Lichtmikroskop werden zunächst beide Augen vom Hühnerkopf entfernt. Als nächster Schritt erfolgt die Abtrennung des Eizahns (rostral) und des hinteren Teils des Kopfes bis zur Orbita (kaudal). Diese Schritte sind notwendig, damit die Probenköpfe vollständig in die Schnittform passen und eine reproduzierbare koronare Schnitfführung möglich ist. Die Fixierung in der Schnitvorrichtung (Kunststoff-Matrize mit 1mm Schnittweite) erfolgt kaudal mit einer Rasierklinge. Die koronare Schnitfführung durch das fixierte Präparat wird mit einer Rasierklinge von rostral nach kaudal, im Abstand von 1 mm, durchgeführt. Bei der Probenpräparation ist auf eine präzise koronare Schnitfführung zu achten, wobei nur wenig Druck auf das respiratorische Epithel ausgeübt werden darf, um eine Ablösung des Epithels zu verhindern. Das freiliegende respiratorische Epithel wird mit PBS gespült, um Reste von Schleimpartikeln und Blut zu entfernen. Abschließend werden die Koronarschnitte in ein Probenrondell zur Entwässerung mit Aceton und der anschließenden KPT übertragen. Die nachfolgenden beschriebenen Arbeitsschritte der Entwässerung und der KPT sind ausführlich im Protokoll 3 im Anhang zu finden. Um das Ausgasen von Wasser aus festen organischen Proben zu verhindern, erfolgt das Entwässern mit einer aufsteigenden Acetonreihe und die KPT. Diese Schritte sind notwendig, weil sonst durch den Prozess des Ausgasens im Hochvakuum während der REM Untersuchung die mikroskopisch kleinen Strukturen, wie z.B. Zilien des Flimmerepithels, zerstört werden können.

In der aufsteigenden Acetonreihe wird schrittweise das Wasser durch Aceton ersetzt. Dazu werden 30%, 50%, 70%, 90% und 100%iges Aceton verwendet. Wichtig dabei ist, dass die Proben über Nacht im 100%igen Aceton belassen werden, damit das Aceton diese vollständig durchdringen kann. Die KPT mit CO₂ ist ein Verfahren, welches sprunghafte Volumenände-

runge vermeidet. Der Kritische Punkt ist der Zustand eines Stoffes, welcher durch einen bestimmten Druck und eine bestimmte Temperatur definiert ist. An diesem Punkt besitzen Flüssigkeiten und Gase desselben Stoffes dieselbe Dichte. Dadurch wird ein Phasenübergang von einem flüssigen in ein gasförmiges Medium vermieden. Somit treten keine zerstörenden Oberflächenspannungen auf. CO₂ ist mit Wasser allerdings nicht ausreichend mischbar, sodass als Zwischenflüssigkeit Aceton verwendet wird, welches sowohl mit Wasser als auch mit CO₂ ausreichend lösbar ist. Die entwässerten Proben werden im nächsten Schritt auf die Probenhalter aufgebracht, damit sie während der REM-Untersuchung nicht verrutschen. Die als Unterlage üblicherweise verwendeten Kohleleitschichten können, aufgrund der Größe der untersuchten Proben, nicht verwendet werden. Stattdessen wird die Probe direkt mit einem Kleber auf dem Probenhalter fixiert. Im nächsten Schritt werden die Proben mit Gold besputtert, damit eine bessere elektrische Leitfähigkeit der Probenoberfläche erreicht wird. Dieser Vorgang ist im Protokoll 4 im Anhang ausführlich beschrieben. In der Probenkammer des Sputter Coaters wird ein Vakuum von 10⁻³ mbar erzeugt und anschließend die Kammer mit einem Argongas, bis zu einem Druck zwischen 5x10⁻² und 7x10⁻² mbar, befüllt. Danach wird eine Stromstärke von 20 mA für 50 s angelegt. Die ionisierten Ar⁺ Moleküle schlagen Goldatome aus dem Target (auch Kathode), welche sich auf der Probenoberfläche niederschlagen und eine oberflächendeckende Goldschicht von circa 10 nm Dicke bilden.

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der REM wird ein im Hochvakuum erzeugter Elektronenstrahl durch nachfolgende elektromagnetische Linsen als kleiner Punkt auf die Oberfläche der Probe fokussiert und anschließend in Rasterform durch den Elektronenstrahl abgetastet. Die von der Probe emittierten Elektronen werden durch unterschiedliche Detektoren aufgefangen und verstärkt. Für die Untersuchungen wird ein Sekundärelektronendetektor verwendet, weil Sekundärelektronen aus oberflächlicheren Schichten der Probe stammen und somit zur Darstellung der Probenoberfläche (Epithel) besser geeignet sind. Für die Untersuchungen wird das Feldemissionsrasterelektronenmikroskop Zeiss Merlin VP compact mit dem HE-SE2 Detektor verwendet. Es wurden für REM-Bilder im Bereich des Flimmerepithels der Nasenhöhle die Vergrößerungen 100X, 300X, 700X, 1000X und 3000X verwendet. Bei Spezialuntersuchungen wurden auch höhere Vergrößerungen von z.B. 80.000X bis 100.000X angewandt.

3.2.4 Artefakte bei der Rasterelektronenmikroskopie

In der Abbildung 17 sind unterschiedliche REM Bilder dargestellt, welche verschiedene Artefakte aufweisen.

Im Bild A ist eine Probe der Concha nasalis media abgebildet, welche verschiedene aufladungsbedingte Artefakte (mit Pfeil markiert) aufweist. Die Artefakte zeigen sich bei der Bildaufnahme durch zu helle Bildbereiche, in welchen einzelne Oberflächenstrukturen nicht mehr zu differenzieren sind. Dies kann auf Fehler beim Sputtervorgang bei komplex gebogenen Oberflächen zurückzuführen sein, sodass nicht alle Bereiche der Probe von einer konstant dicken Goldschicht überzogen werden.

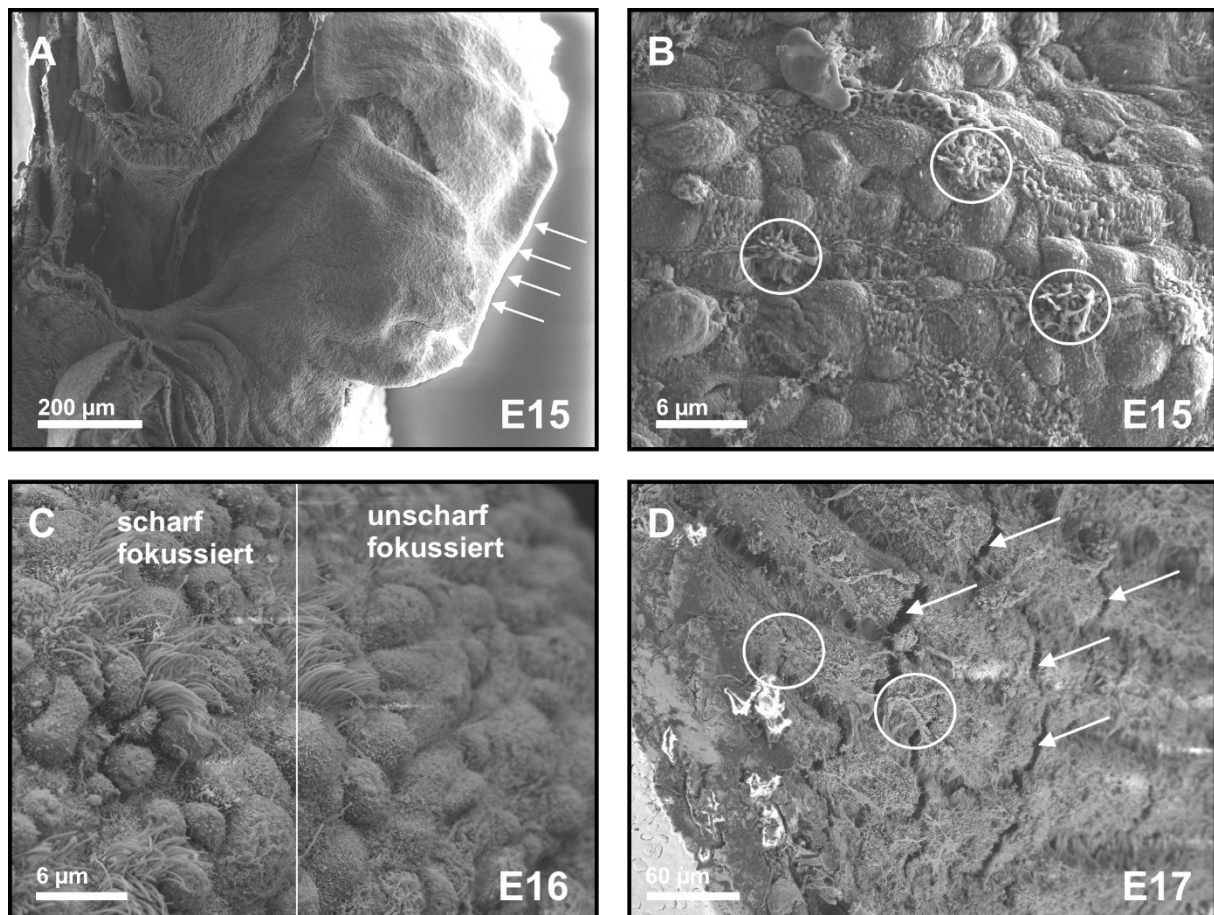


Abbildung 17: REM - Artefakte bei der REM Untersuchung der Regio respiratoria

In der Abbildung 7 sind verschiedene REM Bilder der Nasenhöhle mit unterschiedlichen Artefakten dargestellt. Bild A: Aufladungsartefakte der komplex gebogenen Concha nasalis media, Aufladungen mit Pfeil markiert. Bild B: verwaschene Probenoberfläche des respiratorischen Epithels der Concha nasalis media, Ziliencuster mit Pfeil markiert. Bild C: gebogene Oberfläche, nur ein Teil des Bildes ist scharf fokussiert. Bild D: multiple Artefakte, Kreis markiert: Sekret auf Probenoberfläche, Pfeile markieren Risse im respiratorischen Epithel. Quelle: eigene Darstellung

Das Bild B zeigt eine verwaschene Probenoberfläche, wo die Konturen und einzelne Zilien (mit Kreis markiert) nicht mehr sauber erkennbar sind. Dies kann zum Beispiel durch zu hohe Oberflächenspannungen, während der KPT, mit Zerstörung von Mikrostrukturen an der Probenoberfläche, verursacht worden sein. Bei ungenügend langer Probenzeit im 100%igem Aceton

(weniger als 12h), hat dies nicht genügend Zeit, um Proben wie die Concha nasalis media vollständig zu durchdringen. Dies bedingt Probleme bei der KPT, weil noch Reste von PFA und PBS in der Probe vorhanden sein können. Weiterhin können auch Fehler bei der Fixierung und Reinigung der Probe zu diesem Artefakt führen.

Das Bild C zeigt eine REM Aufnahme der Concha nasalis media mit gebogener Oberfläche. Auf gebogenen Oberflächen kann mit der REM nur ein Teilbereich des Bildes scharf fokussiert werden. Dies führt zu einer Unschärfe und aufladungsbedingten Artefakten im restlichen Teil des Bildes bereits bei einer Vergrößerung von 3000x.

Im Bild D ist eine REM-Aufnahme mit mehreren Artefakten dargestellt. Durch unzureichende Spülung mit PBS ist die Probenoberfläche teilweise mit Sekret (mit einem Kreis markiert) überlagert. Die Risse (mit einem Pfeil markiert) im respiratorischen Flimmerepithel können unter anderem durch zu starken Druck während der koronaren Schnitfführung oder durch Spannungen, während der KPT, welche in allen Gewebsschichten der Probe auftreten können, entstehen. Diese Beispiele verdeutlichen die Schwierigkeiten bei der Probenaufbereitung und der Bildaufnahme bei komplexen kleinen 3D Strukturen, wie der Concha nasalis media, mit den Zilien des respiratorischen Flimmerepithels.

3.2.5 Probenvorbereitung für die Immunofärbung und die H&E Färbung

Die Präparation für die Immunofärbung und die H&E Färbung unterscheiden sich grundlegend von der Präparation für die REM Untersuchung. Dabei werden die in PFA eingelegten Hühnerköpfe in Paraffin eingegossen, bevor Koronarschnitte mit einem Mikrotom angefertigt werden können.

Die nachfolgenden Schritte sind ausführlich im Protokoll 5 erläutert. Die in PFA-fixierten Hühnerköpfe werden mehrmals mit PBS gespült, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe und mit Roti-Histol® entwässert werden. In den nächsten Tagen werden die Hühnerköpfe mit flüssigem Paraffin durchtränkt, bevor sie in eine Form gegossen werden können, um bei Raumtemperatur für die nächsten Tage auszuhärten.

Nach dem groben zurechtschneiden der Paraffinblöcke mittels einer Rasierklinge erfolgt das Einspannen in das Mikrotom. Die Schnitfführung wird beginnend vom Eizahn nach kaudal mit einer Schnittdicke von durchschnittlich 10 µm durchgeführt. Die getrimmten Schnitte werden im nächsten Schritt in ein Wärmebad mit destilliertem Wasser überführt, wo sie sich auf der Wasseroberfläche glätten können. Danach werden die Paraffinschnitte auf einen Objektträger übertragen und auf einer Wärmeplatte (Temperatur 37,7°C) für ca. 12 Stunden getrocknet.

3.2.6 Immunofärbung

Mit der Immunofärbung ist es möglich, das spezifische Antigen acetyliertes alpha-Tubulin in den Kinozilien nachzuweisen, welches ein essenzieller Bestandteil der Zilien ist. Die Acetylierung von alpha-Tubulin ist eine posttranslationale Modifikation. Mittels einer spezifischen Acetylase wird eine Acetylgruppe auf die Aminosäure *Lys40* des alpha Tubulins übertragen (Sigma-Aldrich 2022). Die Acetylierung beeinflusst sowohl die Stabilität der Mikrotubuli als auch ihre Funktion (Eshun-Wilson et al. 2019). Im respiratorischen Epithel ist das acetylierte alpha Tubulin neben den Zilien auch in den Chondrozyten (Poole et al. 2001) sowie in Axonen von Neuronen (Dan et al. 2018) nachweisbar. Dieser Sachverhalt zeigt sich in den untersuchten Zielregionen in der deutlichen Braunfärbung von Chondrozyten, sowie von Axonen der Nerven auf Paraffinschnitten.

In der Abbildung 18 ist schematisch der Ablauf der Immunofärbung dargestellt. Im Protokoll 6 sind die nachfolgenden Schritte ausführlich aufgelistet. Zur Entparaffinierung werden die Schnitte in Roti-Histol® (organisches Lösungsmittel, bestehend zu 96 - 98% aus Limonenschalenöl) getaucht und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Die entparaffinierten Schnitte werden für 10 Minuten in einen Färbekasten mit PBS und danach für weitere 5 Minuten in eine Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween®-20 (PBST) gestellt. Die PBS Lösung ermöglicht ein pH neutrales Spülen (pH-Wert von 7,4). Das Detergens Tween in der PBST Lösung permeabilisiert die Proben, um in den nachfolgenden Schritten den Zugang des Blockpuffers und des Primärantikörpers zu dem Antigen zu verbessern. Als nächster Schritt erfolgt die Inaktivierung endogener Peroxidasen (engl. *quenching of endogenous peroxidase activity*) mit einer 0,3%igen H_2O_2 Lösung für 10 Minuten. Die hochdosierte Gabe von H_2O_2 ist notwendig, um endogene Peroxidaseaktivitäten irreversibel zu hemmen. Die nachfolgenden Schritte werden in der feuchten Kammer durchgeführt. Damit die Proben nicht austrocknen, werden Tücher mit destilliertem Wasser benetzt und unter den Objektträgern platziert. Mit einer Pipette wird der Blockpuffer auf die Objektträger getropft und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Der Blockpuffer verringert das unspezifische Binden des Primärantikörpers und wird deshalb vor diesem aufgetragen. Im nächsten Schritt wird der Primärantikörper, anti-acetyliertes-Tubulin (monoklonal), mit der Verdünnung 1:10.000 auf die Objektträger aufgetragen und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht für mindestens 12 Stunden inkubiert. Um die optimale Verdünnung des Primärantikörpers anti-acetyliertes-Tubulin (monoklonal) für das zilientragende respiratorische Epithel in den Conchae nasales des Haushuhns herauszufinden, erfolgten vorher Verdünnungsreihen mit Verdünnungen von 1:2000, 1:4000, 1:5000, 1:8000, 1:10.000 und 1:20.000. Es zeigte sich, dass das zilientragende Gewebe am besten mit einer Verdünnung von 1:10.000 dargestellt werden kann. Auf den zur Negativkontrolle verwendeten Objektträgern wird der Blockpuffer belassen und kein Primärantikörper appliziert. Nach der Inkubationszeit werden die Proben 3-mal mit

Materialien und Methoden

PBS für jeweils 5 Minuten gespült. Anschließend wird der 1:200 verdünnte biotinylierte-anti-Maus IgG-Sekundärantikörper auf die Proben gegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Biotinylierung des Sekundärantikörpers ist Voraussetzung für die spätere Bindung des Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplexes. Der nicht gebundene Anteil des Sekundärantikörpers wird in zwei Waschschritten mit PBST für jeweils 10 Minuten von dem Objektträger entfernt. Der in dem angesetzten ABC-Reagens enthaltene Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wird mit einer Verdünnung von 1:100 auf die Proben aufgetragen. Der nicht gebundene Anteil des ABC-Reagens wird durch zwei Waschschriffe mit PBS für jeweils 3 Minuten entfernt.

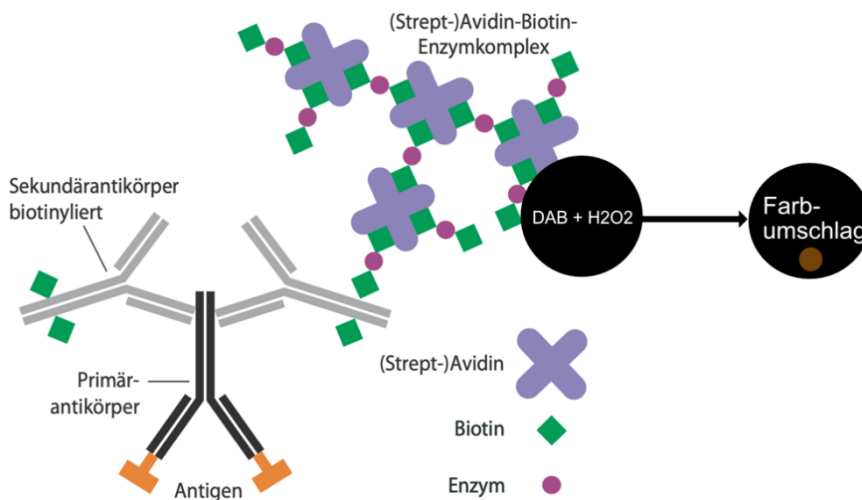


Abbildung 18: Schema des Prinzips der verwendeten Biotin-Streptavidin Immunofärbung; verwendeter Primärantikörper: anti-ac-Tub-Ak, verwendeter Sekundärantikörper: biotinylierter-anti-Maus-IgG. An den Sekundärantikörper binden Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplexe. Nach Zugabe von DAB und H₂O₂ kommt es zu einem braunen Farbumschlag. Quelle: modifiziert nach (Mulisch 2014)

Im nächsten Schritt wird auf die Objektträger die DAB-Lösung pipettiert, welche aus 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und PBS besteht und für 3 Minuten auf den Schnitten belassen wird. Der Hauptgrund ist die Durchtränkung der Präparate mit dem Substrat DAB. Gleichzeitig dient dieser Schritt als Negativkontrolle, da ohne Zugabe des Cosubstrats H₂O₂ keine Farbreaktion auftreten sollte. Im finalen Schritt wird das DAB und das H₂O₂ auf die Objektträger pipettiert und die anschließende Reaktion (Braunfärbung) 7 Minuten beobachtet.

Die gespülten und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässerten Präparate können nun entweder mit dem ROTI®Histokitt eingedeckt werden (Nativpräparat oder es wird zusätzlich eine Gegenfärbung mit H&E durchgeführt).

3.2.7 H&E Färbung

Im Protokoll 7 sind die nachfolgenden Schritte ausführlich aufgelistet. Die modifizierte H&E Färbung wird als Übersichtsfärbung (nur H&E Färbung) und als Gegenfärbung (Immunofärbung und H&E Färbung) angewandt. Der Vorteil der Gegenfärbung mittels H&E auf nativen Schnitten mit Immunofärbung besteht darin, dass zusätzlich zu den angefärbten Antigenen (Braunfärbung) auch die Kerne und das Plasma (Blau-/Rotfärbung) des Gewebes beurteilt werden können. Die H&E-Färbung besteht aus der H&E Färbelösung 1 (modifizierte Hämatoxylinlösung) und H&E Färbelösung 2 (modifizierte Eosin-G-Lösung). Der nach dem Naturprodukt benannte Farbstoff Hämatoxylin, ist ein Metallion-Farbstoff Komplex, aus dem Oxidationsprodukt Hämatein und einem Metallion. Damit besitzt der Farbstoff-Metallion-Komplex positive Ladungen, welcher an anionische Ladungen (z.B. DNA im Zellkern) binden kann. Die Färbelösung 1 enthält Aluminium-Alaun, sodass der Metallion-Farbstoff Komplex als Häma-laun bezeichnet wird. Eosin in der Färbelösung 2 ist ein anionischer Farbstoff und färbt das Zytoplasma, Bindegewebe und die Kollagenfasern kräftig rot.

Die entparaffinierten Schnitte werden durch eine absteigende Ethanolreihe (100%, 75%, 50%) hydriert und im Anschluss für 6 Minuten in die H&E-Lösung 1 (Hämatoxylin pH 3-4) getaucht. Nach dem Abspülen der Objektträger erfolgt eine Differenzierung in 0,1%iger Salzsäure für ca. 10 Sekunden. Um die gewünschte Blaufärbung zu erreichen, werden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser (pH-Wert 7) abgespült. Anschließend erfolgt die Färbung mit der H&E Lösung 2 (Eosin) für ca. 30 Sekunden. Die Schnitte werden anschließend nach dem Abspülen mit Leitungswasser in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 100%) entwässert. Als Intermedium vor dem Eindecken werden die Objektträger in ROTI®Histol getaucht. Das Eindecken der Schnitte erfolgt mit dem ROTI®Histokit.

3.2.8 Untersuchungsbereich in der Nasenhöhle

Die Grenzen des Untersuchungsareals werden bestimmt durch die Ausdehnung des respiratorischen Epithels während der embryonalen Entwicklung in der Nasenhöhle. Innerhalb dieses Bereichs wurden die Concha nasalis media und das Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum ausgewählt. In der Abbildung 4 sind im Bild A und B die Lokalisationen gekennzeichnet. Im folgenden Abschnitt werden der vordere- und hintere Epithelübergang des respiratorischen Epithels präsentiert, welche für die Untersuchungen zusätzlich als anatomische Grenzen dienten. Aufgrund der geringen rostrokaudalen Ausdehnung der Nasenhöhle, besonders in den frühen embryonalen Stadien, dienten die Epithelübergänge als wichtige Orientierungspunkte um die Zielbereiche in rostrokaudaler Schnittrichtung sicher zu identifizieren.

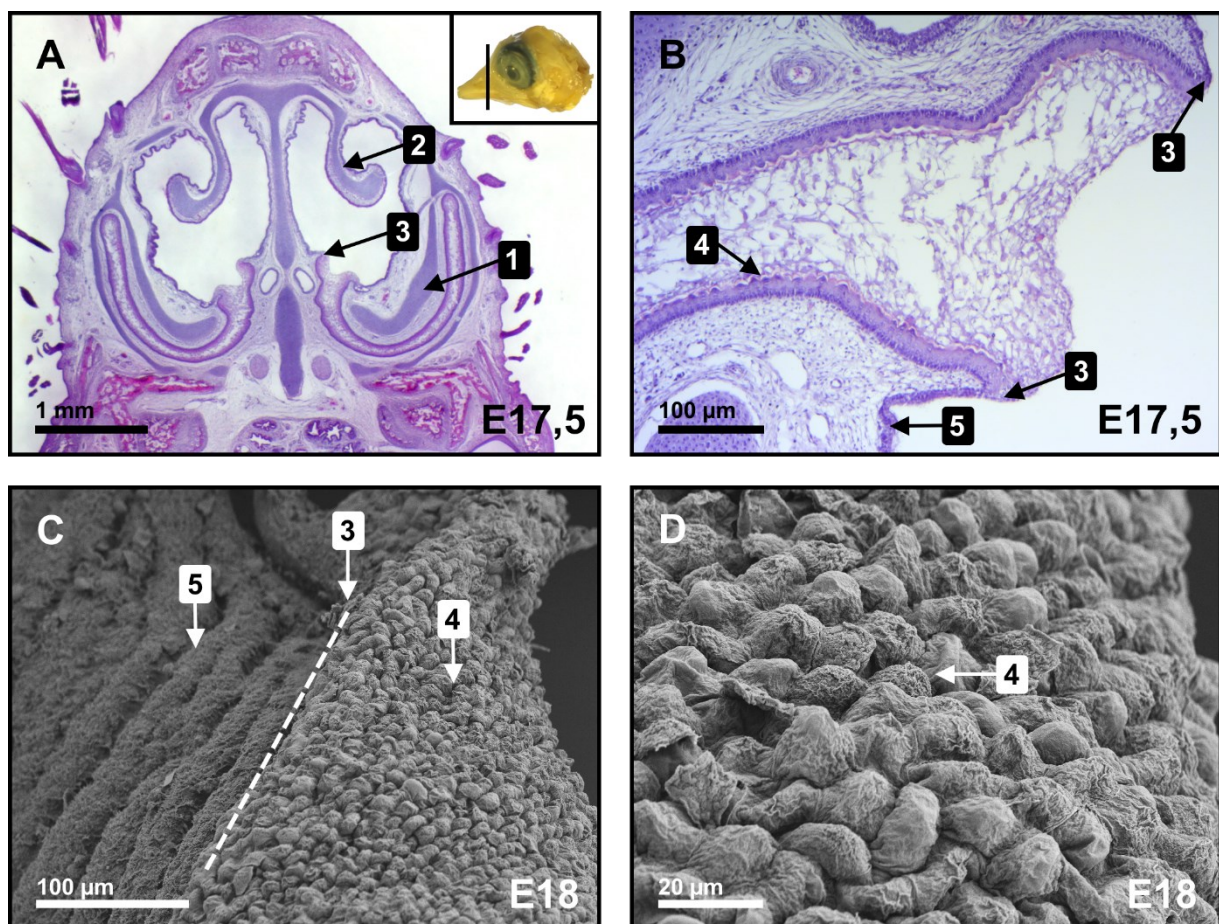


Abbildung 19: REM/H&E Färbung - rostraler Epithelübergang

Die Abbildung 19 zeigt den rostralen Epithelübergang in der Nasenhöhle zwischen dem Plattenepithel und dem respiratorischen Epithel in den Stadien E17,5 und E18. Bild A und B: H&E Färbung an koronaren Paraffinschnitten. Besondere Aufnahmen in denen der auslaufende Nasenvorhof mit der Concha nasalis rostralis (Plattenepithel) und die bereits angeschnittene Nasenhaupthöhle mit der Concha nasalis media (respiratorisches Epithel) in einer Aufnahme abgebildet sind. Bild C und D: REM Aufnahmen. (1) Concha nasalis rostralis, (2) Concha nasalis media, (3) Epithelübergang Plattenepithel zu respiratorischem Epithel, (4) Plattenepithel, (5) respiratorisches Epithel. Der Übergang erfolgt an einer klar konturierten Linie. Quelle: eigene Darstellung

Materialien und Methoden

Der vordere, rostrale Epithelübergang (Abbildung 19, Bild A bis D, 3) befindet sich auf Höhe zwischen dem Nasenvorhof, mit dem Plattenepithel der Concha nasalis rostralis (Bild A, 1) und der Nasenhöhle mit dem respiratorischen Flimmerepithel der Concha nasalis media (Bild A, 2). Die koronare Schnittebene ist im Piktogramm im Bild A verdeutlicht.

Der Übergang des respiratorischen Epithels zum olfaktorischen Epithel (Abbildung 20, Bild A bis D) bildet kaudal die hintere Grenze des Untersuchungsgebietes.

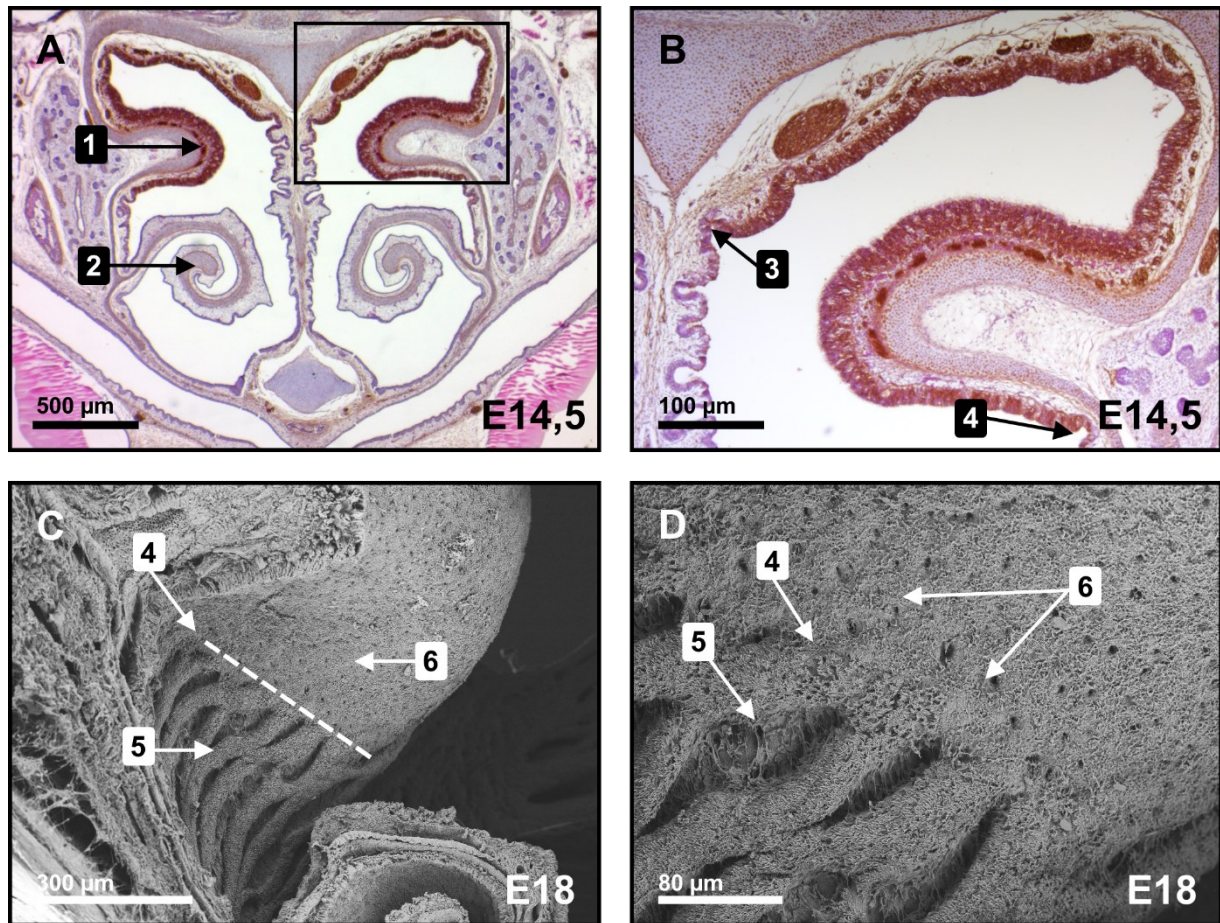


Abbildung 20: REM/Immunofärbung - kaudaler Epithelübergang

Die Abbildung 20 zeigt Koronarschnitte durch die Nasenhöhle auf Höhe der Concha nasalis caudalis mit den Methoden der REM (Bild C und D) und der Immunofärbung mit anti-ac-Tub-AK sowie der H&E Gegenfärbung (Bild A und B). Bild A und B: Stadium E14,5. Bild C und D: Stadium E18. Auf Höhe der Concha nasalis caudalis befindet sich der Übergang zwischen dem respiratorischen Epithel und dem olfaktorischen Epithel. In der Immunofärbung ist das olfaktorische Epithel in diesem Stadium an der höheren Epitheldicke, sowie der stärkeren Braunfärbung erkennbar. Das respiratorische Epithel bildet Epithelfurchen (Bild C) aus, welche am Übergang zum olfaktorischen Epithel abrupt enden. (1) Concha nasalis caudalis, (2) Concha nasalis media, (3) oberer medialer Epithelübergang, (4) unterer lateraler Epithelübergang, (5) respiratorisches Epithel, (6) olfaktorisches Epithel. Quelle: eigene Darstellung

Materialien und Methoden

Der obere mediale Übergang (Bild B, 3) befindet sich an der Grenze vom Nasenhöhlendach zum Nasenseptum, während der untere laterale Übergang (Bild B, 4) am Unterrand der Concha nasalis caudalis liegt. Dabei bedeckt das olfaktorische Epithel (Bild C und D, 6) nicht nur die Concha nasalis caudalis, sondern auch das Nasenhöhlendach auf dieser Höhe, sowie den Übergang zum Nasenseptum. An beiden Lokalisationen ist dieser Übergang durch das abrupte Enden der tiefen Epithelfurchen des respiratorischen Epithels (Bild C und D, 5), sowie durch eine größere Epitheldicke von circa 60 μm und der darunter liegenden angeschnittenen Nervenfasern des embryonalen olfaktorischen Epithels (Bild C und D, 6) gekennzeichnet. Innerhalb dieser Grenzen erfolgten Koronarschnitte durch die Nasenhöhle und die Untersuchung des respiratorischen Epithels.

4. Ergebnisse

4.1 Embryonale Entwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle

Die Epithelentwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle wurde in dieser Dissertation in den embryonalen Stadien E12 bis E18 morphologisch mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie sowie immunzytochemisch anhand einer Antikörperfärbung mit dem Zilienmarker gegen acetyliertes Tubulin untersucht. Zur Untersuchung wurden verschiedene Lokalisationen in der Nasenhöhle (*Cavum nasi*) betrachtet und miteinander verglichen. Die Untersuchungsareale umfassen das respiratorische Epithel der Concha nasalis media und des Nasenseptums (*Septum nasi*) mit dem angrenzenden Nasenhöhlendach. Im Folgenden werden die Ergebnisse anhand ausgewählter repräsentativer Bilder der angefertigten REM-Schnittserien sowie der histologisch gefärbten Paraffinschnitte der embryonalen Entwicklungstage dargestellt und erläutert.

4.1.1 Formen zilientragender Epithelzellen

In der Literatur existiert bisher keine einheitliche Nomenklatur zur Beschreibung der Epitheloberfläche embryonaler respiratorischer zilientragender Epithelzellen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie. Nach Sichtung aller rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestand zunächst die Schwierigkeit, die Oberfläche des Zellverbandes dieser embryonalen Zellen anhand vereinheitlichter Kriterien exakt zu beschreiben. Bei der Analyse der REM Aufnahmen von unterschiedlichen Untersuchungstieren und in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien (E12 bis E18) in beiden untersuchten Zielregionen der Nasenhöhle zeigte sich jedoch ein wiederkehrendes Muster des Auftretens verschiedener zilientragender Epithelzellen. Die respiratorischen Epithelzellen in der Nasenhöhle durchlaufen im Rahmen ihres Reifungsprozesses während der embryonalen Entwicklung verschiedene Phasen mit unterschiedlicher Ausprägung von Zilien an ihrer Oberfläche. Dabei stellten sich in der vergleichenden Betrachtung vier verschiedene Formen zilientragender Epithelzellen während der embryonalen Entwicklung von E12 bis E18 dar, welche im Folgenden systematisch erläutert werden. Die zilientragenden Epithelzellen wurden anhand der Anzahl und Größe der Zilien an der Oberfläche der Epithelzelle, der Ausprägung an Mikrovilli, sowie der Zellkontur, untersucht. Da es sich um keine statistische Auszählung aller im Zellverband vorkommenden Zellen handelt erfolgt die Angabe der Zilienlängen in einem gewählten Bereich.

Epithelzelle mit einem kurzen Monozilium

Im Zellverband des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle konnten besonders in den frühen embryonalen Stadien Epithelzellen nachgewiesen werden, welche auf ihrer Oberfläche ein Monozilium der Länge von unter 2 μm ausbilden (Abbildung 21 und Abbildung 22). Diese erste Form von zilienträgenden Epithelzellen ließen sich sowohl auf der Concha nasalis media als auch auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum nachweisen.

Das Hauptmerkmal dieser Zellart ist die Größe- und Lage des Monoziliums. Die kurzen Monozilien besitzen eine Länge unter 2 μm (Abbildung 21 und Abbildung 22, Bild A bis D, 1) und sind auf der Zelloberfläche zentral, geometrisch fast mittig, gelegen (Abbildung 21, Bild B). Weiterhin besitzen diese Zellen eine glatte, wenig erhabene Oberfläche, einen Besatz mit kurzen Mikrovilli (Bild A, 2) und eine flache Zellgrenze, ohne die Ausbildung eines Randwalls (Bild C, 3).

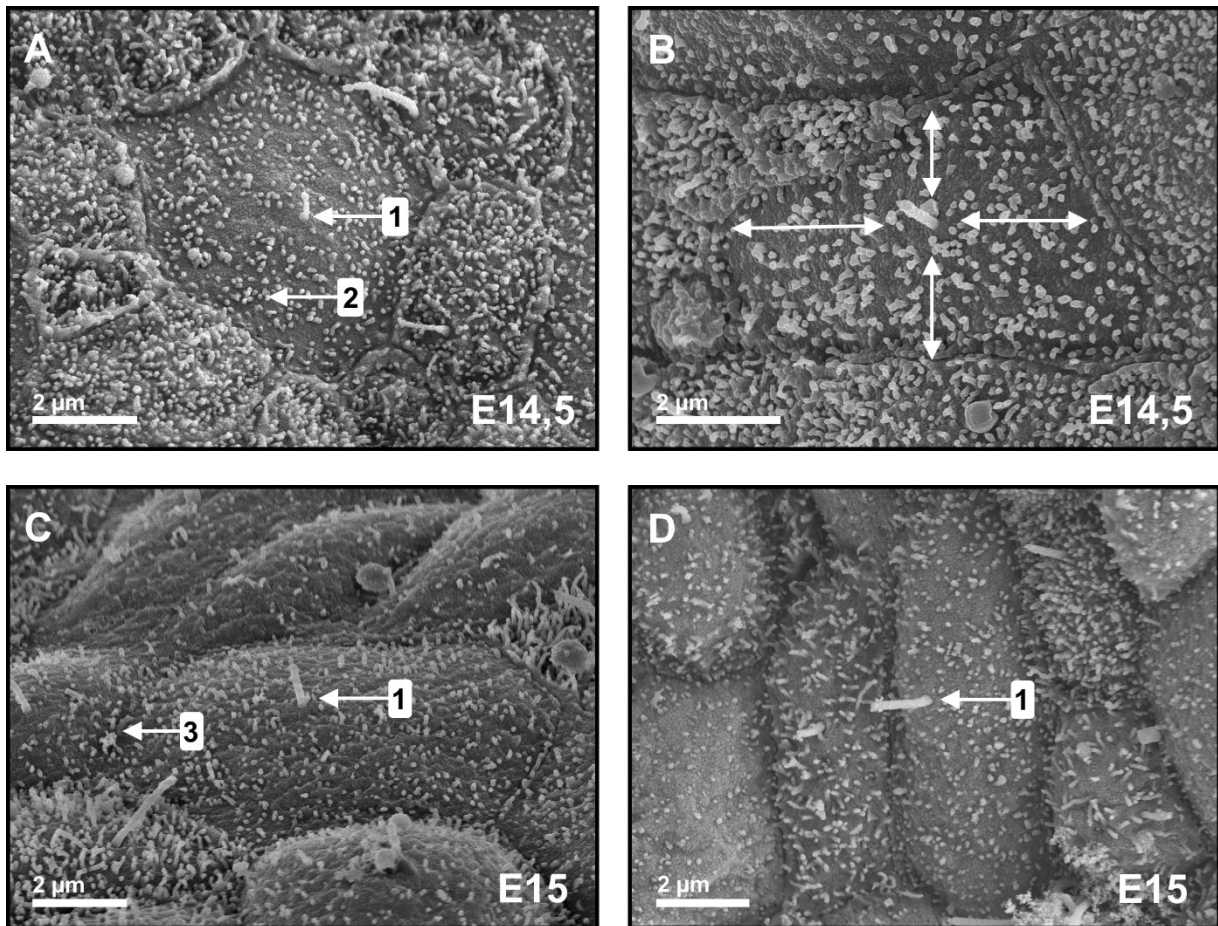


Abbildung 21: REM - Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium/Teil 1

In der Abbildung 21 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der embryonalen Entwicklungstage 14,5 und 15 dargestellt (Bild A und B: E14,5 und Bild C und D: E15). (1) kurzes Monozilium unter 2 μm Länge, (2) Mikrovilli, (3) Zellgrenze ohne Randwall, ($\leftarrow\rightarrow$) Doppelpfeil markiert Monozilium in zentraler Lage. Auffällig sind die unterschiedlich geformten Zelloberflächen im Zellverband mit einem zentral gelegenem kurzen Monozilium. Bild A und D: Sekundärelektronendetektor. Bild C und D: In-Lense-Detektor. (A) Vergr. 10.000 fach, (B) Vergr.12.000 fach, (C) und (D) 9000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Die Zelloberfläche dieser Zellart ist unterschiedlich ausgebildet. So finden sich Zellen, deren Zelloberflächen einem Hexagon (Honigwabenform) (Abbildung 21, Bild A und C) ähneln, längliche Zellen in Form eines Rechtecks (Abbildung 21, Bild D) sowie kreisrunde Zelloberflächen (Abbildung 22, Bild B).

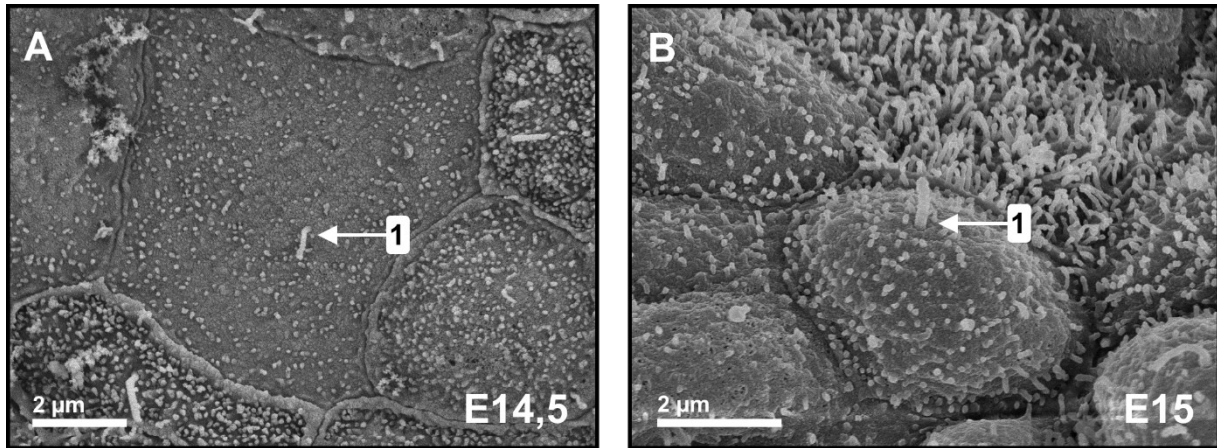


Abbildung 22: REM - Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium/Teil 2

In der Abbildung 22 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der embryonalen Entwicklungstage 14,5 und 15 dargestellt (Bild A: E14,5 und Bild B: E15). (1) kurzes Monozilium unter 2 µm Länge. Auffällig sind die unterschiedlich geformten Zelloberflächen im Zellverband (Bild A: unregelmäßig in Form eines Hexagons, Bild B: rundliche Zelloberfläche) mit einem zentral gelegenem kurzen Monozilium. (A) Vergr. 9.000 fach, (B) Vergr. 12.000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Epithelzelle mit einem elongierten Monozilium

Im Rahmen der Entwicklung des respiratorischen Epithels existieren Epithelzellen im Zellverband, welche an ihrer Oberfläche ein Monozilium der Länge von circa 4 bis 6 µm ausbilden (Abbildung 23, Bild A bis F). Diese Epithelzellart lässt sich während der embryonalen Entwicklung sowohl auf der Concha nasalis media als auch auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum nachweisen. Die Hauptmerkmale dieser Zellart sind das elongierte Monozilium der Länge zwischen 4 bis 6 µm (Bild A und B, 1), der dichte flächendeckende Besatz mit langen Mikrovilli (Bild F, 6) sowie ein ausgeprägter erhabener, breiter Randwall (Bild C und D, 3) als Zellgrenze. Die Zellform dieser Zellart ist ebenfalls unregelmäßig ausgebildet, wobei sich feststellen lässt, dass die Zelloberfläche kleinflächig ist und einer rechteckigen bis elliptischen Form entspricht. Der Randwall ist deutlich erhaben, breit und besitzt nur vereinzelt Mikrovilli (Bild C und D). Die Zellen sind klar von der Umgebung abgrenzbar. Zellen mit einem elongierten Monozilium besitzen an ihrer Zelloberfläche einen dichten Besatz mit langen Mikrovilli. Dies zeigt sich deutlich im direkten Vergleich zwischen Zellen mit einem elongierten Monozilium (Bild E und F, 6) und Zellen mit einem kurzen Monozilium (Bild E und F, 7). Im Bild E ist zusätzlich mit einem Doppelpfeil der direkte Längenunterschied zwischen einem kurzen Monozilium (Bild E, 4) und einem elongierten Monozilium (Bild E, 5) dargestellt. Zusammenfassend ist damit eine eindeutige Differenzierung der beiden Zellarten mit einem Monozilium anhand der oben beschriebenen Kriterien möglich.

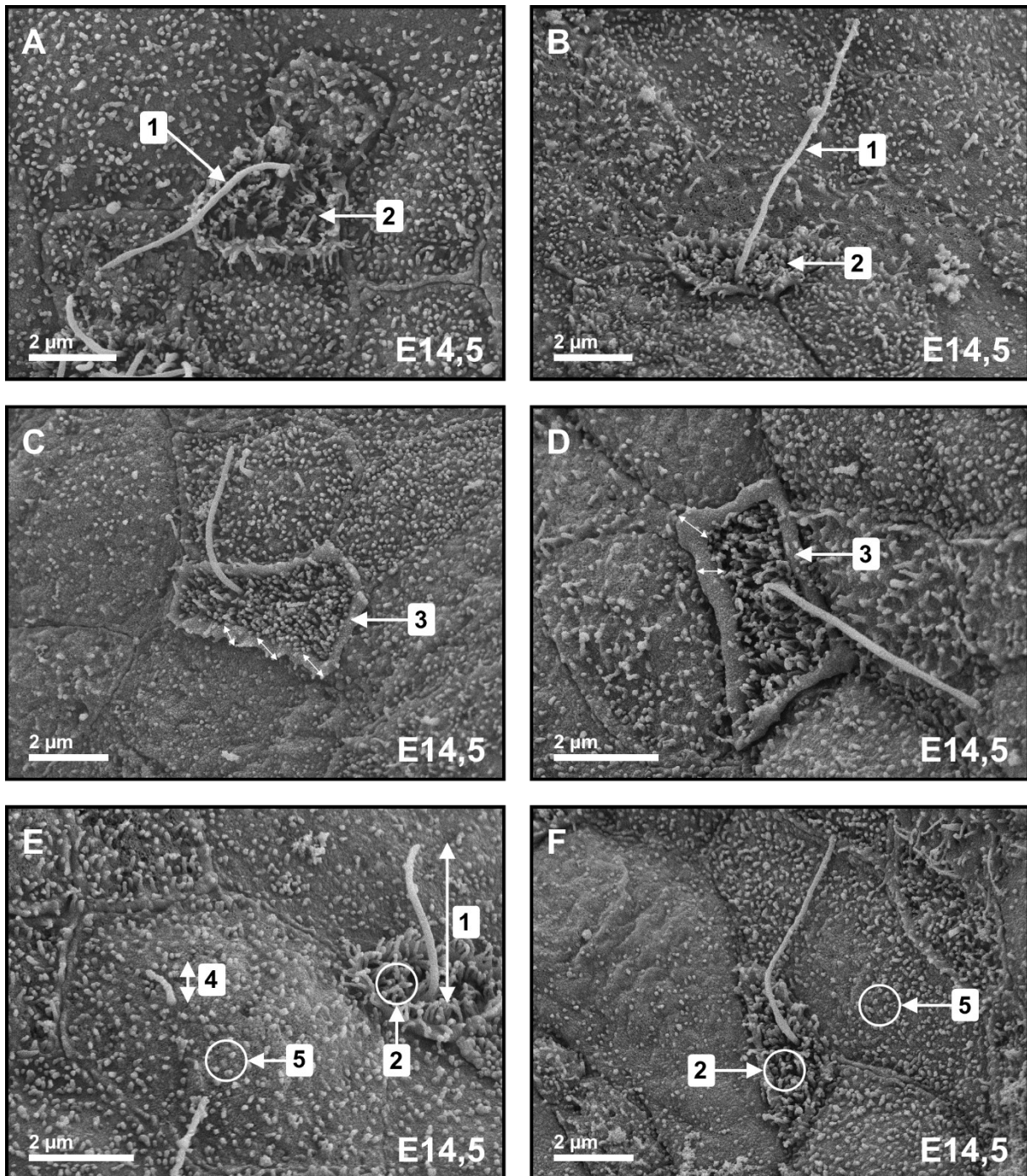


Abbildung 23:

REM - Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium

In der Abbildung 23 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen des embryonalen Entwicklungstages 14,5 dargestellt. In enger Nachbarschaft sind Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium und Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium in diesem Stadium sichtbar. **(1)** Monozilium der Länge von circa 6 µm, **(2)** lange Mikrovilli mit einem Kreis markiert, **(3)** erhabener, breiter Randwall mit Doppelpfeilen markiert, **(4)** kurzes Monozilium unter 2 µm Länge, Länge mit einem Doppelpfeil markiert, **(5)** kurze Mikrovilli mit einem Kreis markiert. Die Bilder E und F zeigen den direkten Größenvergleich zwischen einem kurzen und einem elongierten Monozilium sowie deren unterschiedlichen Besatz mit Mikrovilli. Auffällig ist außerdem, dass die Mikrovilli von Zellen mit einem elongierten Monozilium flächendeckend vorhanden sind, sodass die Zelloberfläche vollständig bedeckt ist. Die Zellform stellt sich zumeist schmaler und länglicher dar als die von Zellen mit einem kurzen Monozilium. **(A)** Vergr. 10.000 fach, **(B), (C) und (F)** Vergr. 9.000 fach. **(D) und (E)** Vergr. 12.000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Unreife multiziliäre Zelle

Als unreife multiziliäre Zelle (Abbildung 24, Bild A bis D) wird eine embryonale Flimmerepithelzelle definiert, welche auf ihrer Oberfläche unterschiedlich lange Zilien ausbildet. Die meisten Zilien einer Zelle haben noch nicht ihre vollständige Länge von 5 bis 6 μm erreicht (Bild A und B, 1). In Abhängigkeit von der Länge und der Anzahl der bereits ausgebildeten Zilien einer Zelle ist ihre Zelloberfläche mit den Mikrovilli (Bild B, 2), im Gegensatz zu einer reifen multiziliären Zelle, noch einsehbar. Die Zilien mit unterschiedlicher Länge sind dabei diffus auf der einzelnen Zelloberfläche verteilt und folgen keinem konstantem Verteilungsmuster. Wenn mehrere unreife multiziliäre Zellen nebeneinander liegen und einen Zellcluster bilden, können die Zellgrenzen nicht mehr sicher identifiziert werden und die Zelloberfläche ist gegenüber den Nachbarzellen erhabener (Bild C).

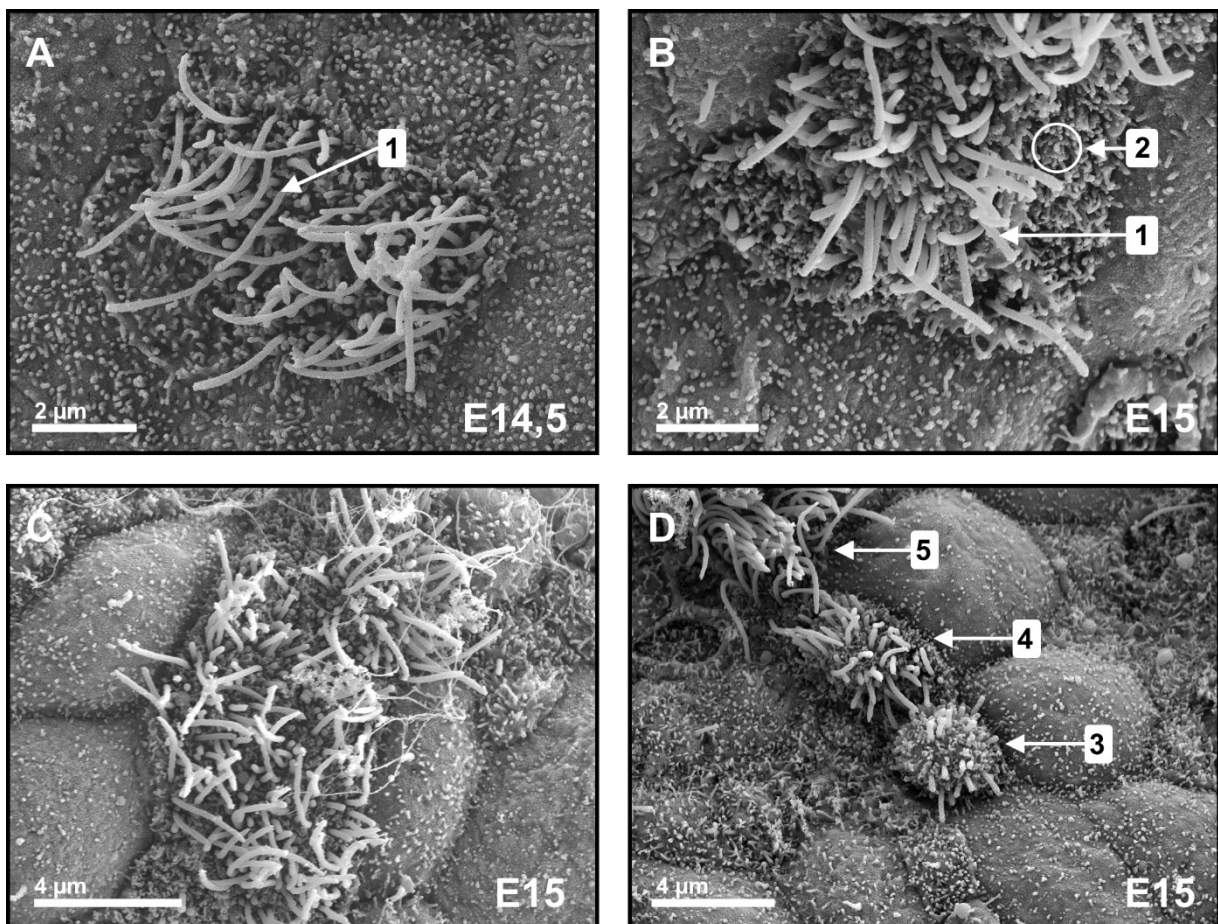


Abbildung 24: REM - unreife multiziliäre Zellen

In der Abbildung 24 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der embryonalen Entwicklungsstadien 14,5 und 15 dargestellt (Bild A: E14,5 und Bild B bis D: E15). (1) unreife multiziliäre Zelle mit unterschiedlich langen Zilien, (2) Mikrovilli, (3), (4) und (5) unreife multiziliäre Zellen in unterschiedlichen Reifestadien und morphologischen Ausprägungsformen. Das Bild C zeigt einen Zellcluster aus unreifen multiziliären Zellen, wobei die Zell-Zellgrenzen nicht sicher abgrenzbar sind. (A) und (B) Vergr. 10.000 fach, (C) Vergr. 7.000 fach, (D) Vergr. 6.000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Im Bild D sind unreife multiziliäre Zellen in einer Reihe (Bild D, 3 bis 5) in unterschiedlichen Reifestadien nebeneinander abgebildet. Am unteren Rand des Zellclusters zeigt sich eine Zelle (Bild D, 3) welche multiple Zilien zwischen 1 bis 2 μm besitzt. Bereits in enger Nachbarschaft zu dieser Zelle zeigen sich ebenfalls unreife multiziliäre Zellen (Bild D, 4 und 5), welche Zilien mit einer Länge bis zu 5 μm ausbilden.

Reife multiziliäre Zelle

Als reife multiziliäre Zelle (Abbildung 25 und Abbildung 26) wird eine embryonale Flimmerepithelzelle definiert, welche auf ihrer Oberfläche multiple ausgewachsene Zilien mit einer Länge von circa 5 bis 6 μm besitzt. Das Bild A, der Abbildung 25, zeigt einen geschlossenen Zellverband reifer multiziliärer Zellen. Die Zelloberfläche der einzelnen multiziliären Zelle ist aufgrund des dichten Besatzes mit Zilien nicht mehr einsehbar (Bild B).

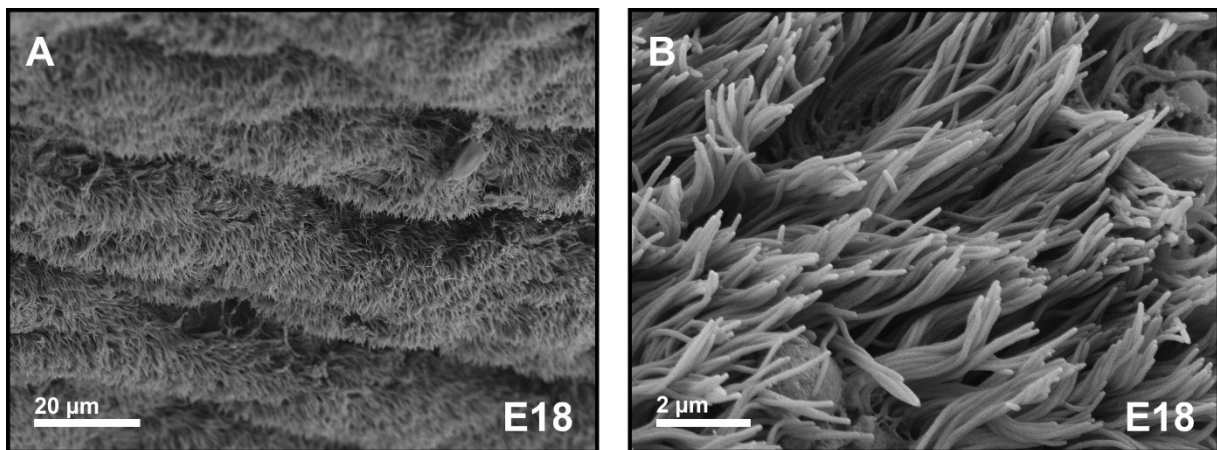


Abbildung 25: REM - reife multiziliäre Zellen/Teil 1

In der Abbildung 25 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen des embryonalen Entwicklungstages 18 dargestellt. Das Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme einer geschlossenen Epitheldecke von reifen multiziliären Zellen mit der Ausbildung von regelmäßigen Epithelfurchen. Eine Vergrößerung der Epitheloberfläche ist im Bild B dargestellt. (A) Vergr. 1.000 fach, (B) Vergr. 9.000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Bei reifen multiziliären Zellen ist aufgrund des flächendeckenden Besatzes mit Zilien an der Oberfläche eine exakte Längenbestimmung in einer REM Aufnahme in Draufsicht nicht sicher möglich. Aus diesem Grund wurden REM Aufnahmen an Schnittkanten angefertigt, welche einen Längsschnitt durch die reifen multiziliären Zellen, mitsamt der longitudinalen Zilienlänge, darstellen. Diese sind in der Abbildung 26 dargestellt. Im Bild A bis C ist an der Bruchkante eine exakte Längenbestimmung der Zilien einer reifen multiziliären Zelle möglich (Im Bild A, 1 mit einem Doppelpfeil markiert). Unter der Zelloberfläche finden sich perlschnurartig aufgereihte Basalkörper (Bild A bis C, 2).

Ergebnisse

Auf dem Bild D sind auf dem respiratorischen Flimmerepithel Erythrozyten (Bild D, 3) abgebildet. Beim Haushuhn beträgt der längliche Durchmesser eines Erythrozyten circa 12 μm (Milo et al. 2022) und damit ungefähr die doppelte Zilienlänge einer reifen multiziliären Zelle.

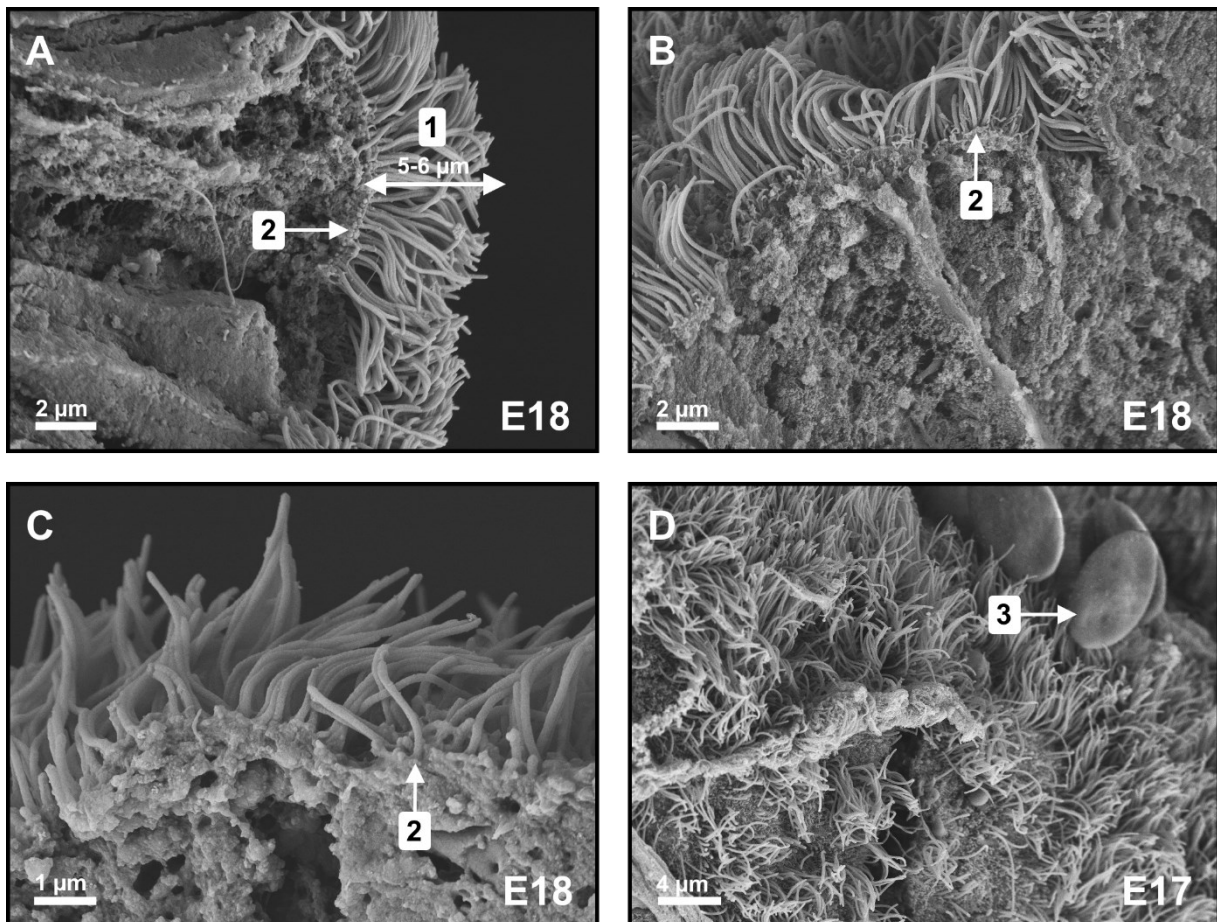


Abbildung 26: REM - reife multiziliäre Zellen/Teil 2

In der Abbildung 26 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der embryonalen Entwicklungsstadien 17 und 18 dargestellt (Bild A bis C: E18 und Bild D: E17). Die Bilder A, B und C sind Bruchkanten-aufnahmen und erlauben eine Längenbestimmung der Zilien. Das Bild D demonstriert einen Größenvergleich zwischen Erythrozyten des Hühnchens und der Zilien. (1) Zilien der Länge von 5-6 μm reifer multiziliärer Zellen, (2) Basalkörper, (3) Erythrozyt eines Hühnchens. (A) und (B) Vergr. 6.000 fach, (C) Vergr. 12.000 fach, (D) Vergr. 3.000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Die Tabelle 3 dient als zusammenfassende Übersicht der verschiedenen Formen zilientragender Epithelzellen während der Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle. Anhand der Merkmale erfolgte die standardisierte Auswertung der weiteren REM Aufnahmen im folgenden Ergebnisteil.

Formen zilientragender Epithelzellen während der Entwicklung	Merkmale
<p>Epithelzelle mit einem kurzen Monozilium = <i>engl. epithelial cell with non elongated monocilium</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - embryonale respiratorische Epithelzelle mit einem zentral gelegenen Monozilium der Länge von bis zu 2 μm - Besatz mit kurzen Mikrovilli - flache Zellgrenze, ohne die Ausbildung eines Randwalls
<p>Epithelzelle mit einem elongierten Monozilium = <i>engl. epithelial cell with elongated monocilium</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - embryonale respiratorische Epithelzelle mit einem Monozilium der Länge von 4 bis 6 μm - dichter flächendeckender Besatz mit langen Mikrovilli - ausgeprägter erhabener, breiter Randwall als Zellgrenze - Zellform unregelmäßig konfiguriert, Zelloberfläche zumeist rechteckig bis elliptisch
<p>unreife multiziliäre Zelle = <i>engl. nascent multiciliated cell</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - embryonale Flimmerepithelzelle mit unterschiedlich langen Zilien, viele Zilien unter 5 bis 6 μm lang, kein konstantes Verteilungsmuster - einzelne Zellgrenzen im Zellcluster nicht abgrenzbar
<p>reife multiziliäre Zelle = <i>engl. fully grown multiciliated cell</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - embryonale Flimmerepithelzelle, die Zilien besitzen eine Länge von 5 bis 6 μm. - Zelloberfläche nicht mehr einsehbar

Tabelle 3: Formen zilientragender Epithelzellen während der Entwicklung mit Merkmalen; Quelle: eigene Angaben

4.1.2 Concha nasalis media - Rasterelektronenmikroskopie

In den folgenden Abschnitten wird die embryonale Entwicklung des respiratorischen Epithels auf der Concha nasalis media in den Entwicklungsstadien E12 bis E18 rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Der Schwerpunkt liegt auf der Beschreibung des zeitlichen und örtlichen Auftretens der verschiedenen Formen zilientragender Epithelzellen (Tabelle 3).

Stadium E12, E13 und E14

In den Entwicklungsstadien E12, E13 und E14 (Abbildung 27, Bild A bis D) sind die meisten Epithelzellen im Zellverband unregelmäßig geformt, besitzen eine glatte, nicht erhabene Oberfläche mit Mikrovilli und zeichnen sich durch ein kurzes Monozilium (Bild A, B und D, 1) der Länge unter $2\ \mu\text{m}$ aus. Die Zellformen sind in diesen Stadien sehr unregelmäßig. Es finden sich sowohl rhomboide-, als auch runde- und elliptische Zellen im Zellverband.

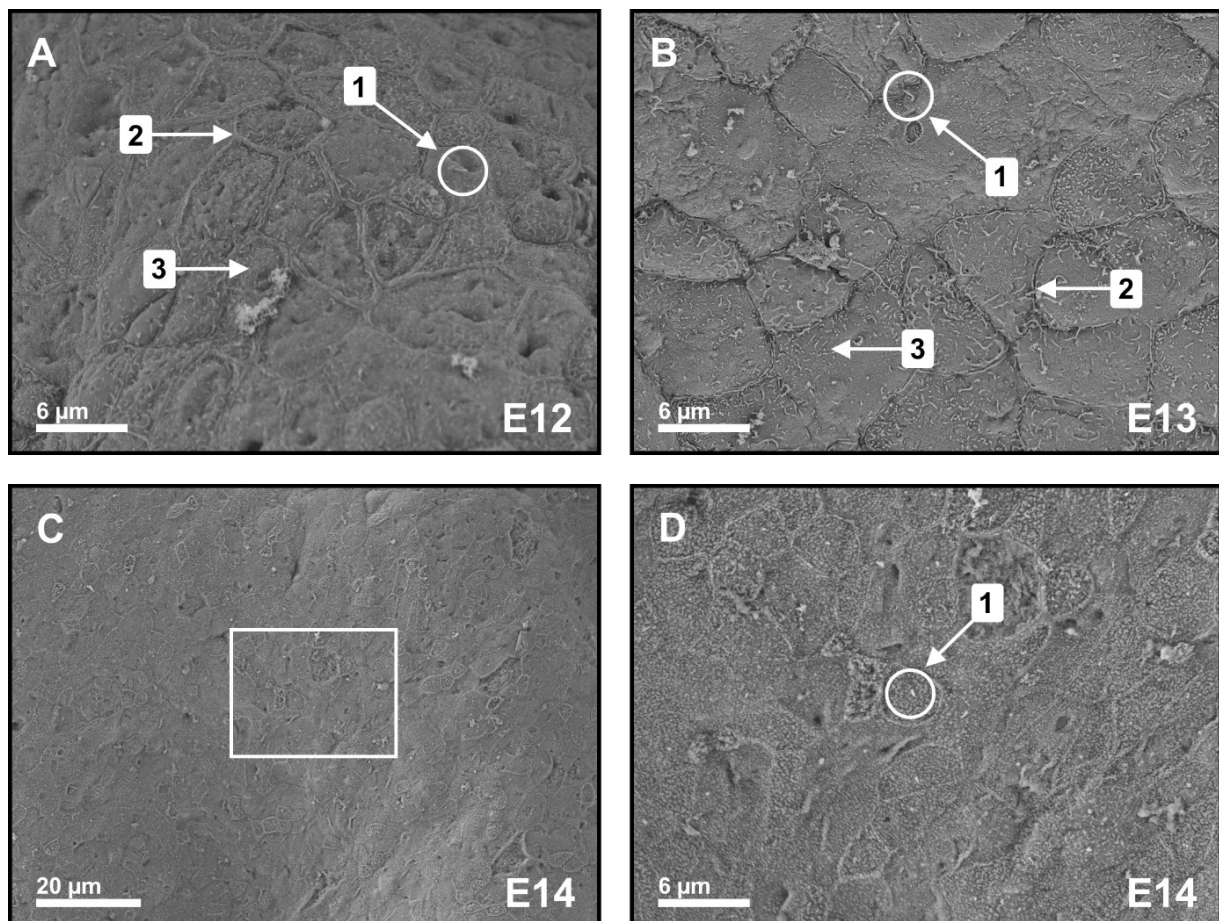


Abbildung 27: REM - Epithel der Concha nasalis media - E12 bis E14

In der Abbildung 27 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der Concha nasalis media der embryonalen Entwicklungstage 12 bis 14 dargestellt. (1) kurzes Monozilium ist eingekreist und mit einem Pfeil markiert, (2) Zell-Zellgrenze, (3) Mikrovilli. Einzelne differenzierte Zellen (z.B. multiziliäre Zellen, Goblet-Zellen) lassen sich im Zellverband in diesen Stadien noch nicht abgrenzen. (A), (B) und (D) Vergr. 3000 fach, (C) Vergr. 1000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Eine Unterscheidung zwischen embryonalen Epithelzellen, welche sich in späteren Stadien zu Flimmerepithelzellen differenzieren und Epithelzellen, welche sich zu anderen Zellen des respiratorischen Epithels entwickeln (z.B. Goblet-Zellen), kann anhand der Oberflächenstruktur nicht getroffen werden. Die Zell-Zellgrenzen sind in diesen Stadien nur schwer zu identifizieren (Bild A und B, 2). Die Anzahl sowie das Verteilungsmuster der kleinen Mikrovilli (Bild A und B, 3) und die zentrale Lage des kurzen Monoziliums auf den einzelnen Zellen kann als Anhaltspunkt dienen, verschiedene Zellen zu identifizieren. Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, sowie multiziliäre Zellen existieren in diesen Stadien im Zellverband nicht. Zusammenfassend können die Entwicklungsstadien E12 bis E14 als Vorläuferstadien aufgefasst werden, bevor sich die embryonalen Epithelzellen differenzieren können und es zur Ausprägung von weiteren Formen zilientragender Epithelzellen kommt.

Stadium E14,5

Im Stadium E14,5 (Abbildung 28 und Abbildung 29) existieren erstmals drei definierte Formen zilientragender Epithelzellen parallel im Zellverband. Zusätzlich zu den Zellen mit einem kurzen Monozilium (Abbildung 28, 1) lassen sich in diesem Stadium bereits Zellen mit einem elongierten Monozilium (Abbildung 28, 2) und vereinzelt unreife multiziliäre Zellen (Abbildung 28, 3) nachweisen.

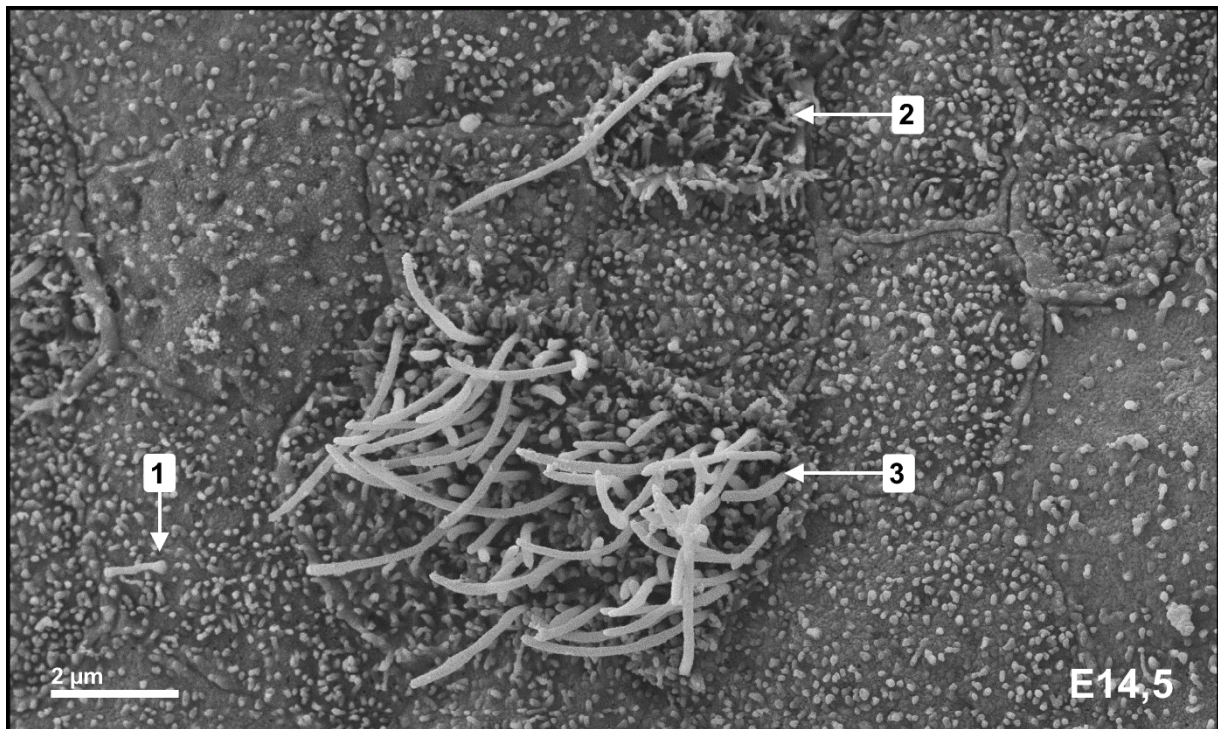


Abbildung 28: REM - Epithel der Concha nasalis media - E14,5/Teil 1

In der Abbildung 28 ist eine REM Aufnahme von Epithelzellen der Concha nasalis media am embryonalen Entwicklungstag 14,5 dargestellt. (1) Epithelzelle mit einem kurzen Monozilium, (2) Epithelzelle mit einem elongierten Monozilium, (3) unreife multiziliäre Zelle; erstmaliger Nachweis von drei Formen zilientragender Epithelzellen im Zellverband. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Das Hauptmerkmal in diesem Entwicklungsstadium ist das erstmalige diffuse Auftreten von elongierten monoziliären Zellen und unreifen multiziliären Zellen auf der Concha nasalis media, welche keinem lokalen Verteilungsmuster folgen. Im Bild A, C und E der Abbildung 29 sind Übersichtsaufnahmen von drei Lokalisationen der Concha nasalis media dargestellt. Die Bilder B, D und F sind Vergrößerungen von Ausschnitten der Übersichtsaufnahmen, welche die lokalen Unterschiede im Verteilungsmuster dieser Zellarten verdeutlichen.

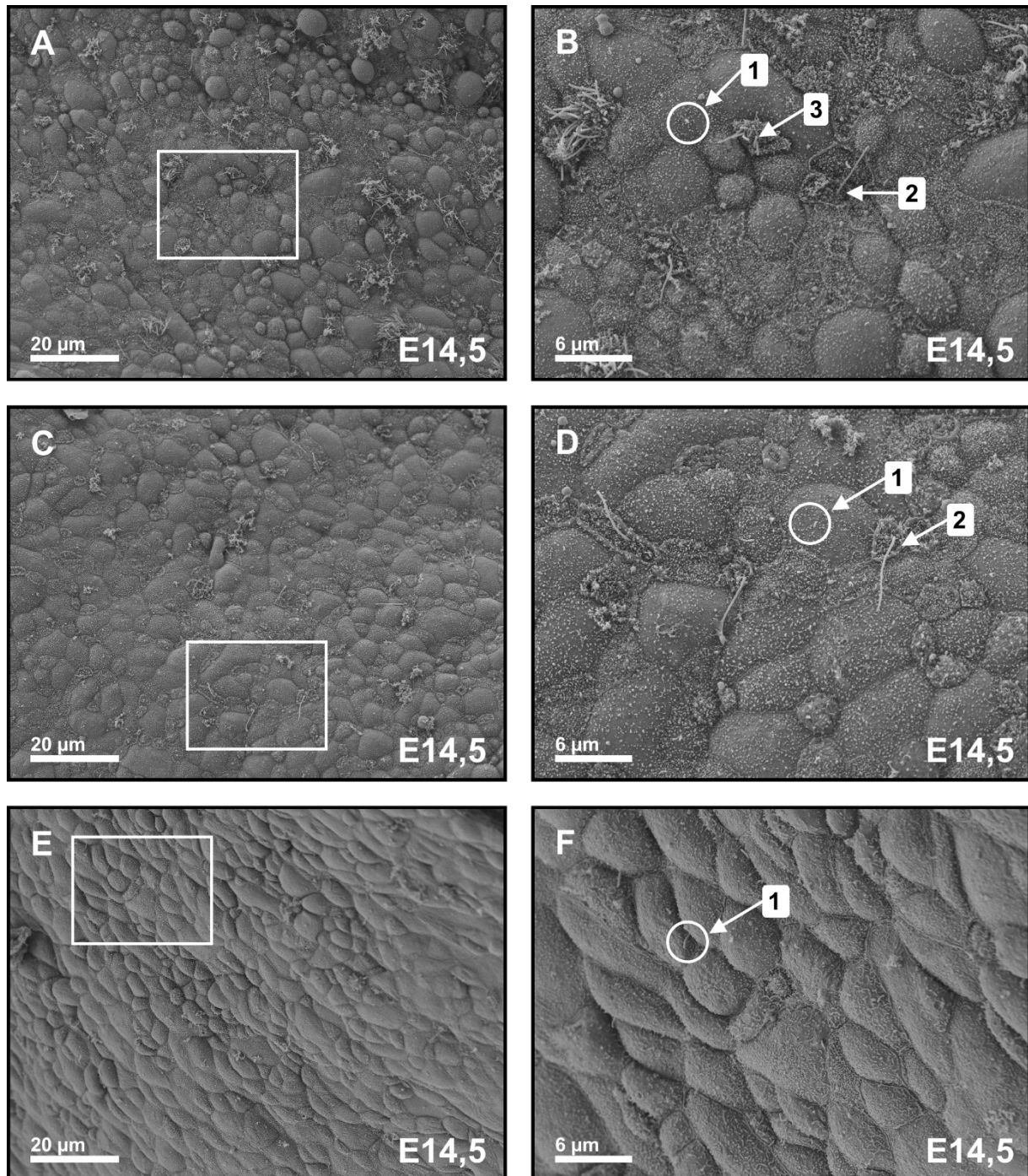


Abbildung 29: REM - Epithel der Concha nasalis media - E14,5/Teil 2

Die Bilder in der linken Spalte (A, C und E) stellen Übersichtsaufnahmen dar. Die Bilder B, D und F sind die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen. **(1)** Epithelzelle mit einem kurzen Monozilium, **(2)** Epithelzelle mit einem elongierten Monozilium, **(3)** unreife multiziliäre Zelle. **(A), (C) und (E)** Vergr. 1000 fach, **(B), (D) und (F)** Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Das Bild B zeigt einen klassischen repräsentativen Zellverband für das Entwicklungsstadium E14,5 mit dem parallelen Auftreten von drei Formen zilientrager Epithelzellen. Zusätzlich zu diesem klassischen Muster lassen sich vereinzelt auch Areale auf der Concha nasalis media nachweisen, welche von diesem Muster abweichen. So zeigt das Bild D einen Zellverband mit dem Nachweis von Epithelzellen mit einem kurzen- oder elongierten Monozilium. Das Bild F zeigt ein Areal, in welchem Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium dominieren.

Die Zellkonturen der embryonalen Epithelzellen sind insgesamt im Vergleich zu den früheren Stadien deutlicher zu erkennen, weil die einzelnen Zellen erhabener sind und zusätzlich einen höheren Besatz mit Mikrovilli aufweisen. Eine weitere Gemeinsamkeit in diesem Entwicklungsstadium ist das Fehlen von reifen multiziliären Zellen im Zellverband.

Zusammenfassend ist das Stadium E14,5 durch das erstmalige Auftreten von Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium und unreifen multiziliären Zellen im Zellverband gekennzeichnet.

Stadium E15 und E16

Im Stadium E15 (Abbildung 30, Bild A und B) nimmt die Anzahl der Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium (Bild B, 1) im Vergleich zu den Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium zu. Gleichzeitig erhöht sich die Anzahl der unreifen multiziliären Zellen im Zellverband (Bild B, 2). Ab diesem Stadium lassen sich erstmals auch Zellcluster aus unreifen multiziliären Zellen nachweisen. Die Epitheloberfläche in diesem Stadium ist deutlich konturiert, die Erhabenheit der Zellen nimmt im Vergleich zu den früheren Entwicklungsstadien weiter zu. Unreife multiziliäre Zellen besitzen, im Vergleich zu den Nachbar-epithelzellen, einen vermehrten Besatz mit Mikrovilli und sind nur schwer gegeneinander abgrenzbar. Reife multiziliäre Zellen lassen sich in diesem Stadium nicht im Zellverband nachweisen.

Im Stadium E16 (Abbildung 30, Bild C und D) nimmt die Anzahl von unreifen multiziliären Zellen (Bild D, 2) im Zellverband stark zu. Die unreifen multiziliären Zellen treten in Zellclustern auf, welche im Vergleich zum Stadium E15 an Größe zunehmen. Erstmals finden sich reife multiziliäre Zellen (Bild D, 3) mit Zilien von bis zu 6 μm Länge im Zellverband. Zusätzlich lassen sich noch einige Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium (Bild D, 1) oder einem kurzen Monozilium nachweisen. Der Besatz mit Mikrovilli, ist im Vergleich zu den vorherigen Stadien, fast flächendeckend vorhanden. Die Erhabenheit der einzelnen Epithelzellen nimmt im Vergleich zum Stadium E15 weiterhin zu. Dies zeigt sich in der halbkugelartigen (tropfenartigen) Ausstülpung der Zelloberfläche. Eine Differenzierung der Zellgrenzen zwischen einzelnen multiziliären Zellen ist aufgrund des Besatzes mit Zilien und Mikrovilli nur eingeschränkt möglich. Als Anhaltspunkt können die Zellgrenzen von monoziliären Zellen dienen, welche sich zwischen den multiziliären Zellen befinden und gut abgrenzbar sind (Bild D, 4).

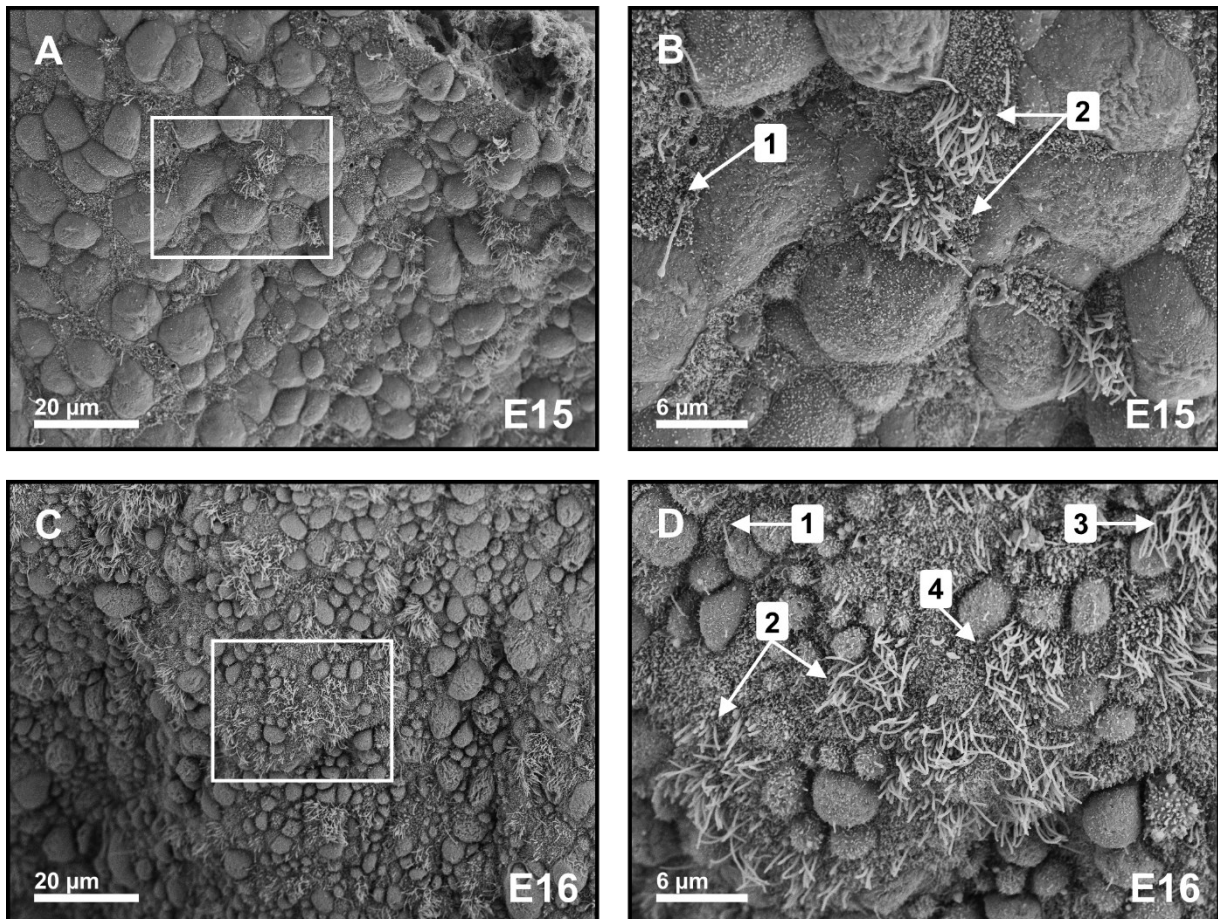


Abbildung 30: REM - Epithel der Concha nasalis media - E15/E16

In der Abbildung 30 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der Concha nasalis media der embryonalen Entwicklungstage 15 bis 16 dargestellt. Die Bilder in der linken Spalte (A und C) stellen Übersichtsabbildungen dar. Die Bilder B und D sind die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen. (1) Epithelzelle mit einem elongierten Monozilium, (2) unreife multiziliäre Zellen, (3) reife multiziliäre Zelle, (4) Differenzierung von Zellgrenzen zwischen multiziliären Zellen anhand der verbleibenden monoziliären Zellen im Zellverband. Stadium E15: sehr heterogen, paralleles Vorkommen vieler Arten zilientragender Epithelzellen im Zellverband, Stadium E16: Zunahme der clusterartig angeordneten unreifen multiziliären Zellen und erstmaliger Nachweis von reifen multiziliären Zellen. Zu beachten ist ebenfalls der direkte Größenunterschied zwischen Epithelzellen im Stadium E15 (große, breite Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium) und den Epithelzellen im Stadium E16 (einzelne unreife multiziliäre Zellen sind schwer abgrenzbar aber im direkten Größenvergleich kleiner). Im Stadium E16 imponieren Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium eher tropfenförmig. (A) und (C) Vergr. 1000 fach, (B) und (D) Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Stadium E17 und E18

Im Stadium E17 (Abbildung 31, Bild A und B) nimmt die Anzahl reifer multiziliärer Zellen im Zellverband stark zu. Die Cluster aus reifen multiziliären Zellen (Bild B, 3) werden größer und konfluieren miteinander, sodass über weiten Teilen der Concha nasalis media fast ein flächendeckender Besatz mit diesen Zellen vorhanden ist. In den Arealen zwischen diesen Clustern finden sich unter anderem noch Zellen mit einem elongierten Monozilium (Bild B, 1) und einzelne unreife multiziliäre Zellen (Bild B, 2). Aufgrund der hohen Anzahl von multiziliären Zellen im Zellverband sind konkrete Aussagen zur Epithelerhabenheit und mit dem Besatz von Mikrovilli nur noch eingeschränkt möglich.

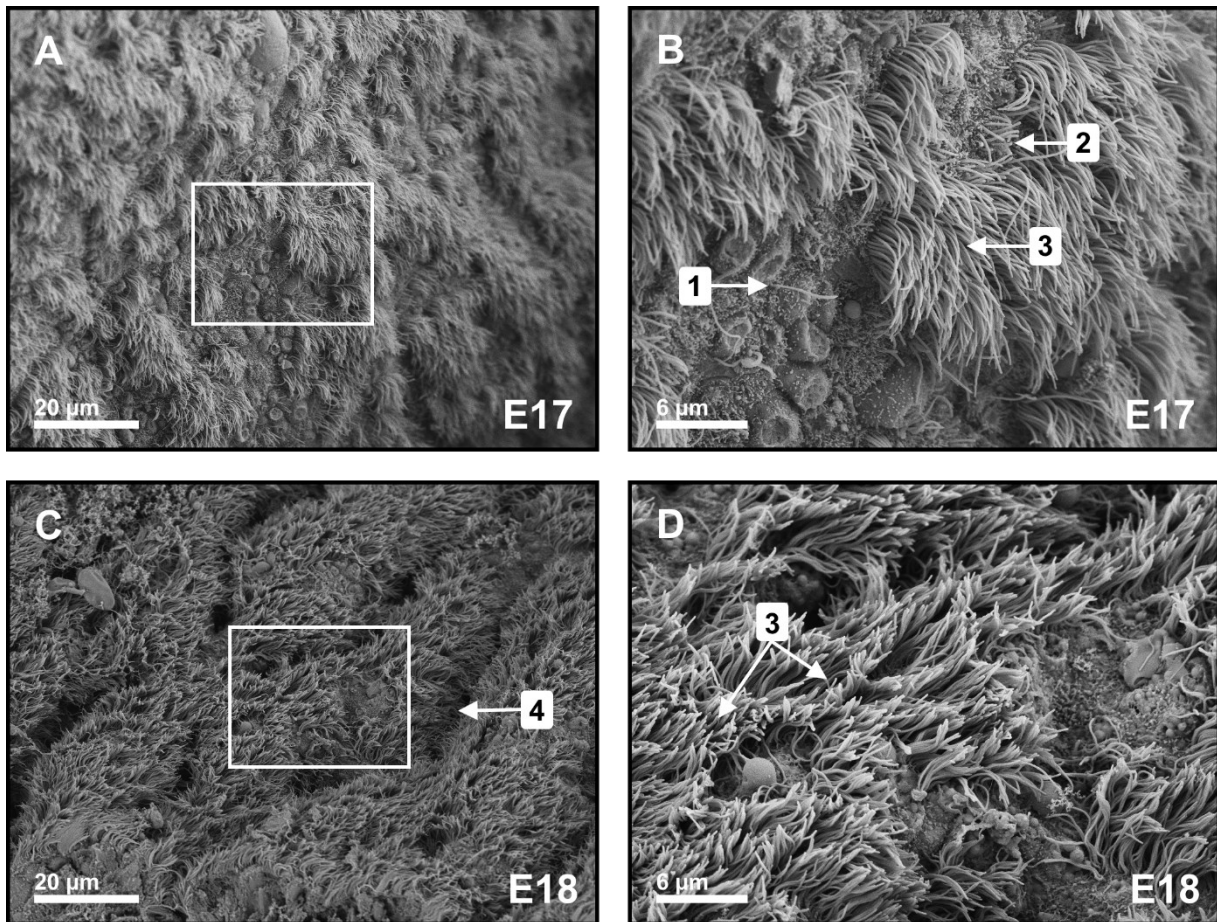


Abbildung 31: REM - Epithel der Concha nasalis media - E17/E18

In der Abbildung 31 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen der Concha nasalis media der embryonalen Entwicklungstage 17 bis 18 dargestellt. Die Bilder in der linken Spalte (A und C) stellen Übersichtsaufnahmen dar. Die Bilder B und D sind die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen. **(1)** Epithelzelle mit einem elongierten Monozilium, **(2)** unreife multiziliäre Zellen, **(3)** reife multiziliäre Zelle, **(4)** Epithelfurche. Stadium E17: überwiegendes Vorkommen von reifen multiziliären Zellen, auffällig sind zudem die Lücken im Zellverband, in welchen trotz des vorangeschrittenen Alters noch Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium nachweisbar sind. Stadium E18: flächendeckender Verband mit reifen multiziliären Zellen, Entwicklung im Hinblick auf den Besatz mit Zilien ist abgeschlossen. **(A) und (C)** Vergr. 1000 fach, **(B) und (D)** Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Das Stadium E18 (Abbildung 31, Bild C und D) ist gekennzeichnet durch einen geschlossenen Zellverband von reifen multiziliären Zellen (Bild D, 3). Die embryonale Entwicklung des respiratorischen Epithels, in Bezug auf die Ausbildung von Zilien, ist abgeschlossen. Dieser Aspekt zeigt sich auch durch die Ausbildung von Epithelfurchen (Bild C, 5), welche regelmäßig parallel nebeneinander angeordnet sind. Im Gegensatz dazu ist dieses Phänomen im Stadium E17 noch nicht sicher nachweisbar. Aussagen zum Vorkommen von Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium sind im Stadium E18 aufgrund des geschlossenen Besatzes mit multiziliären Zellen nur noch eingeschränkt möglich.

Ergebnisse

Die Tabelle 4 ist eine zusammenfassende Darstellung des Vorkommens der definierten Formen von zilientragenden Epithelzellen in den Stadien E12 bis E18 auf der Concha nasalis media. In dieser Tabelle ist das Vorkommen dieser Zellarten pro Entwicklungsstadium jeweils mit einem Pluszeichen „+“, einem Minuszeichen „-“ oder einem Pluszeichen in Klammern „(+“ visuell dargestellt. Das Minuszeichen bedeutet den fehlenden Nachweis dieser Zellen im Zellverband im jeweiligem Entwicklungsstadium. Ein Pluszeichen kennzeichnet den Nachweis dieser Zellform im Zellverband, mit der Eigenschaft des gehäuften Auftretens in Zellclustern (mehrere Zellen einer Zellform in direkter Nachbarschaft). Das rarefizierte Vorkommen (Pluszeichen in Klammern) wird definiert als den vereinzelt Nachweis dieser Zellen im Zellverband ohne eine Clusterbildung.

Embryonaler Entwicklungsstag (E)	E12	E13	E14	E14,5	E15	E16	E17	E18
Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium	+	+	+	+	+	(+)	-	-
Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium	-	-	-	+	+	+	(+)	-
unreife multiziliäre Zellen	-	-	-	(+)	+	+	+	-
reife multiziliäre Zellen	-	-	-	-	-	(+)	+	+

Tabelle 4: Vorkommen monozilärer/multizilärer Zellen auf der Concha nasalis media, Untersuchungsstadien E12 bis E18; - kein Vorkommen dieser Zellen, (+) rarefiziertes Vorkommen dieser Zellen = vereinzelt Vorkommen dieser Zellart ohne Clusterbildung, + Vorkommen dieser Zellen = Nachweis dieser Zellart im Zellverband mit gehäuften Auftreten in Zellclustern unterschiedlicher Größe. Quelle: eigene Darstellung

4.1.3 Concha nasalis media - Immunofärbung

Im folgenden Kapitel wird die Entwicklung des respiratorischen Epithels auf der Concha nasalis media in Bezug auf das Auftreten von multiziliären Zellen mit der Immunfärbung beschrieben. Aufgrund der sich verändernden Größenverhältnisse der Nasenhöhle während der embryonalen Entwicklung wurden aus den circa 30 bis 50 angefertigten koronaren Paraffinschnitten pro embryonalem Kopf die Schnitte exemplarisch ausgewählt, welche jeweils derselben Schnittebene auf Höhe der Mitte der Concha nasalis media entsprachen (Abbildung 32). Diese exemplarische Schnitte wurden mit der Immunfärbung mit dem Zilienmarker anti-ac-Tub-Ak (brauner Farbniederschlag) und anschließend mit einer H&E Gegenfärbung (rötlich-blaue Zellfärbung) versehen. Wie im Methodenteil im Kapitel der Immunfärbung erläutert, erfolgt der Nachweis von multiziliären Zellen im Zellverband mit Hilfe eines gebundenen Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplexes der ein chromogenes Substrat (DAB) zu einem bräunlichen Niederschlag umsetzt.

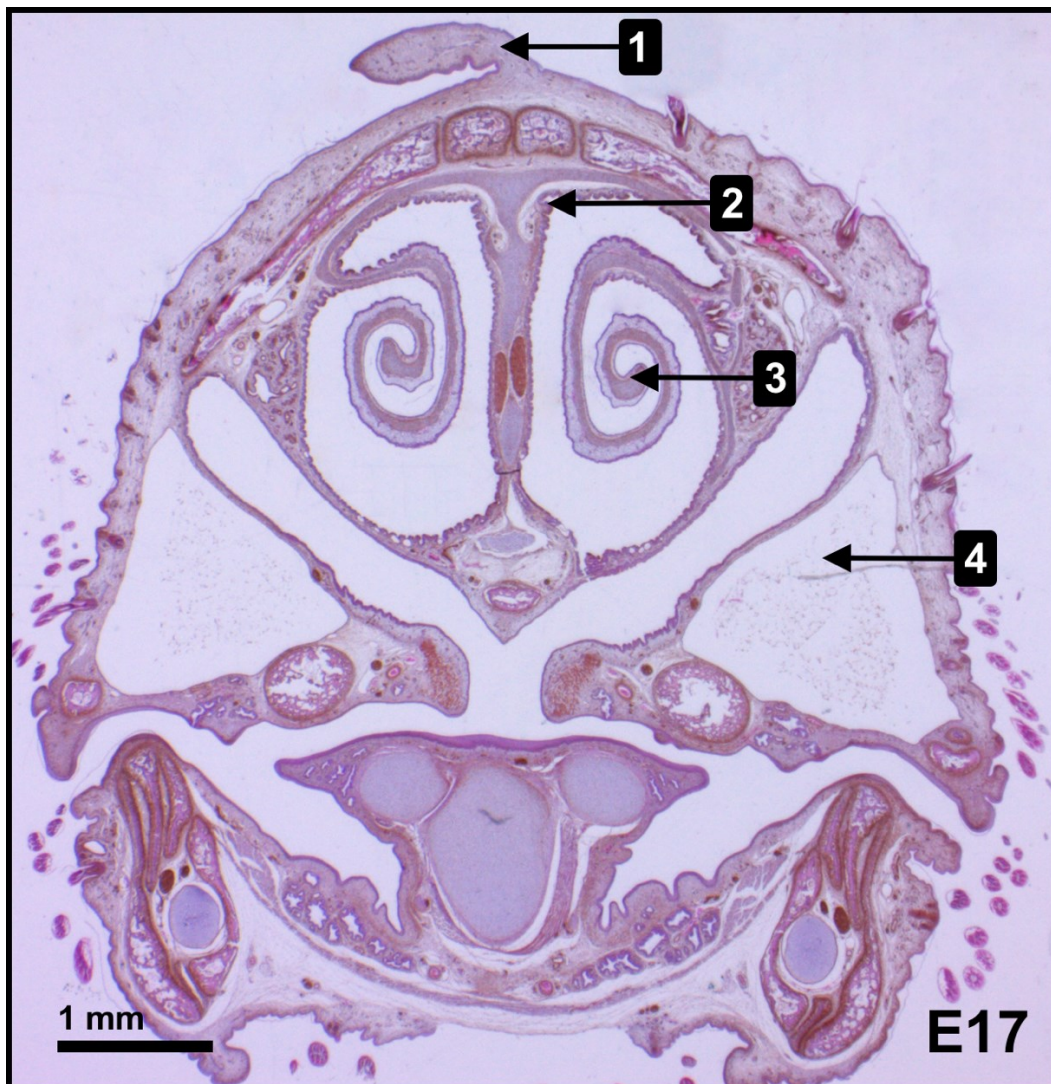


Abbildung 32: Immunofärbung/H&E - Koronarschnitt durch den embryonalen Hühnerkopf, auf Höhe der Mitte der Concha nasalis media, Stadium E17; (1) Hühnerkamm (*Crista carnea*), (2) Nasenseptum mit dem angrenzenden Nasenhöhlendach, (3) linke Concha nasalis media, (4) Sinus infraorbitalis. Quelle: eigene Darstellung

Stadium E12 bis E14,5

In der Abbildung 33 sind Koronarschnitte durch die Concha nasalis media in den Entwicklungsstadien E12 bis E14,5 gezeigt. Die Concha nasalis media (Bild A, Cn) ist an ihrer charakteristisch gewundenen Form erkennbar und besteht aus dem außenliegenden respiratorischen Epithel (Bild A, 1), der darunterliegenden Schicht aus Bindegewebe, auch *Lamina propria* genannt (Bild A, 2) und der formgebenden Knorpellamelle (Bild A, 3). In den Koronarschnitten ist neben der Concha nasalis media auch die laterale Nasenhöhlenwand (Bild A, Nhw) abgebildet, welche an der Oberfläche ebenfalls respiratorisches Epithel trägt. In den Entwicklungsstadien E12 bis E14,5 (Abbildung 33, Bild A bis D) ist auf der Concha nasalis media keine spezifische Immunreaktivität der Epitheloberfläche zu erkennen. Die Epitheloberfläche stellt sich glatt und ohne regelmäßige tiefe Epithelfurche dar.

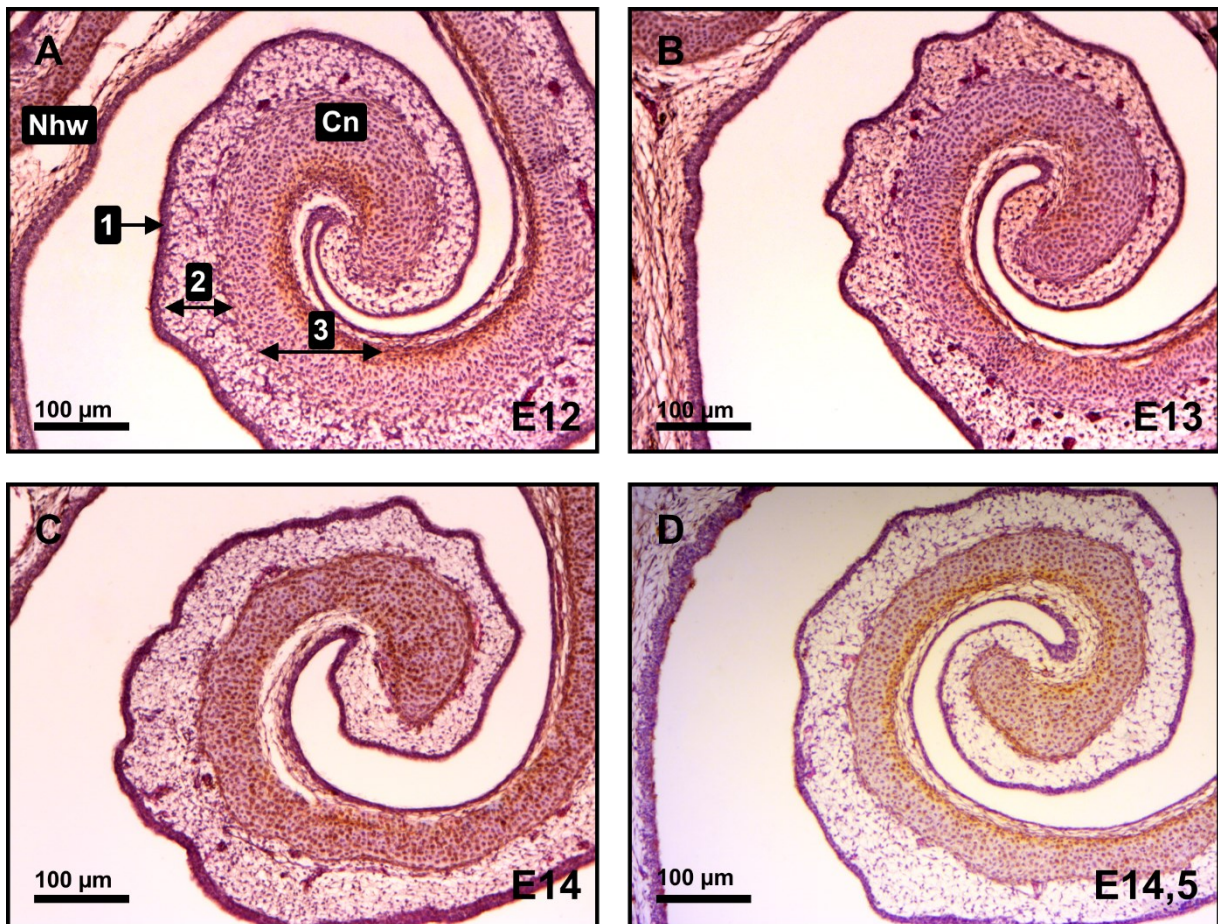


Abbildung 33: Immunofärbung/H&E - Concha nasalis media - E12 bis E14,5

In der Abbildung 33 sind koronare Paraffinschnitte durch die Concha nasalis media mit einer Immunofärbung mit anti-ac-Tub-Ak und einer H&E Gegenfärbung der embryonalen Entwicklungstage 12 bis 14,5 dargestellt. (Cn) Concha nasalis media, (Nhw) laterale Nasenhöhlenwand, (1) respiratorisches Epithel der Conche, (2) Bindegewebsschicht (Lamina propria), (3) Knorpelschicht mit unspezifischer Anfärbung. In diesen Stadien sind keine Cluster von immunpositiven Zellen (Braunfärbung) an der Epitheloberfläche zu erkennen. Die Epitheloberfläche stellt sich ohne tiefe Epithelfurchen dar. Quelle: eigene Darstellung

Stadium E15 und E16

Im Stadium E15 (Abbildung 34, Bild A und B) zeigen sich vereinzelt immunoreaktive Zellcluster (Braunfärbung) (Bild B, 1) auf der Epitheloberfläche der Concha nasalis media, welches für die Anwesenheit von multiziliären Zellen spricht. Im Bild B ist ein vergrößerter Ausschnitt der Concha nasalis media dargestellt, in welchem die Epithelbeschaffenheit beurteilt werden kann. Bereits im Stadium E15 stellt sich das respiratorische Epithel einschichtig mehrreihig, jedoch noch ohne die Ausbildung von tiefen Epithelfalten, dar.

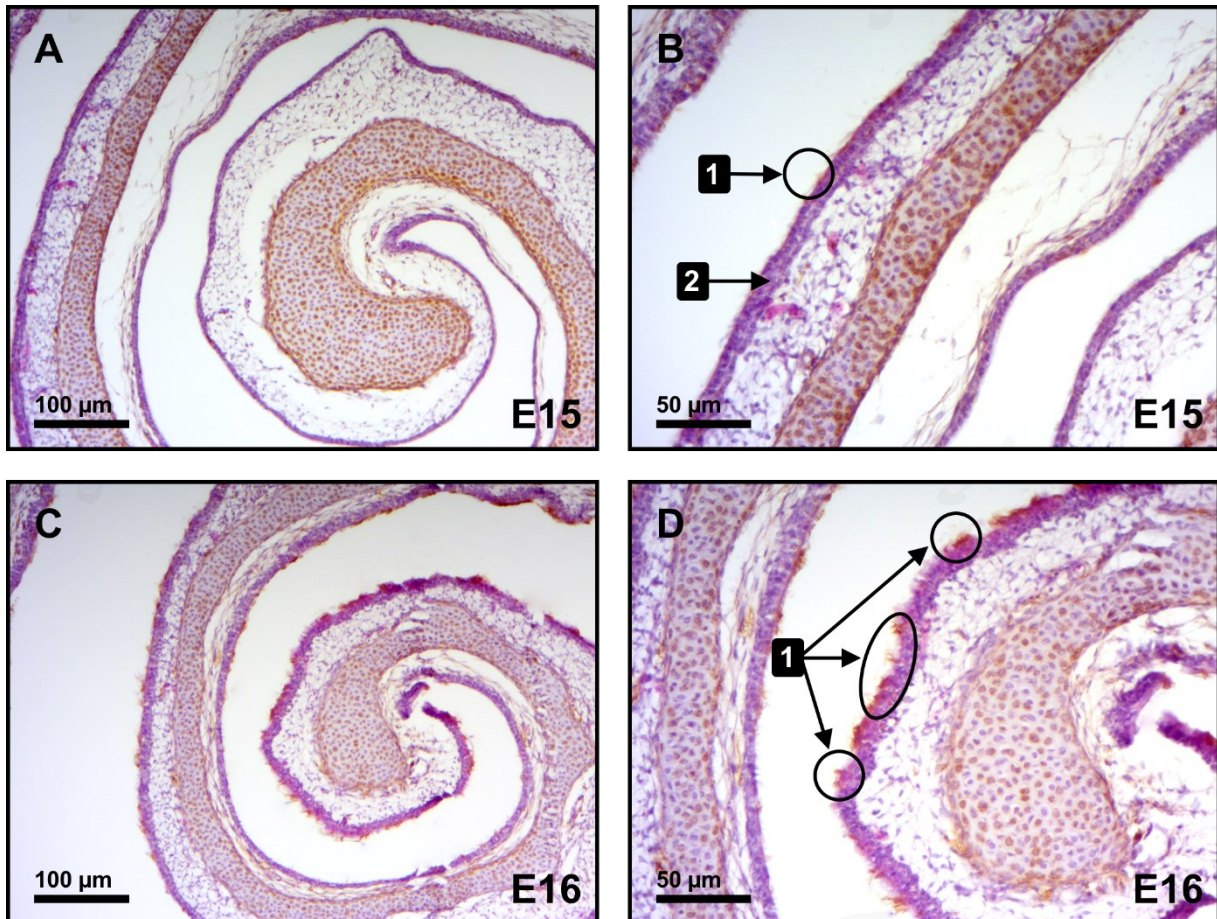


Abbildung 34: Immunofärbung/H&E - Concha nasalis media - E15 und E16

In der Abbildung 34 sind koronare Paraffinschnitte durch die Concha nasalis media mit einer Immunofärbung mit anti-ac-Tub-Ak und einer H&E Gegenfärbung der embryonalen Entwicklungstage 15 und 16 dargestellt. Die Bilder A und C, auf der linken Seite, sind Übersichtsaufnahmen. Die Bilder B und D sind Ausschnittsvergrößerungen. (1) Cluster von immunpositiven Zellen (Braunfärbung) an der Epitheloberfläche, einzelne feinste Zilien sind bereits abgrenzbar (2) einschichtig mehrreihiges Epithel. Im Stadium E16 sind vermehrt immunpositive Zellen an der Oberfläche abgrenzbar. Quelle: eigene Darstellung

Im Stadium E16 (Abbildung 34, Bild C und D) lassen sich mit der Immunofärbung multiple Cluster an multiziliären Zellen nachweisen (Bild D, 1), welche anhand einer fokalen Braunverfärbung der Epitheloberfläche deutlich hervortreten. Die einzelnen Cluster von multiziliären Zellen sind unregelmäßig an der Epitheloberfläche verteilt. Auch in diesem Stadium ist die Epitheloberfläche noch glatt und bildet keine tiefen Epithelfurchen aus, präsentiert sich jedoch deutlich unregelmäßiger konfiguriert als im vorangegangenen Stadium.

Stadium E17 und E17,5

Im Stadium E17 (Abbildung 35, Bild A und B) nimmt die Anzahl der multiziliären Zellen, im Vergleich zum Stadium E16, im Zellverband zu (Bild B, 1). Eine Immunreaktivität ist bis auf wenige Areale flächendeckend an der Oberfläche des Epithels erkennbar. Im Bild B ist ein vergrößerter Ausschnitt der Concha nasalis media dargestellt. Wichtig bei der Beurteilung der Epithelbeschaffenheit ist die Tatsache, dass die Dicke der Windungen der Concha nasalis media nur circa 125 μm beträgt. Das mehrreihige Flimmerepithel (Bild B, 2) besitzt in diesem Stadium eine Dicke von circa 25 μm . Die darunterliegende Schicht aus Bindegewebe (Bild B, 3) mit den enthaltenen Nerven (Bild B, 5) und Blutgefäßen (Bild B, 6) hat eine Dicke von 40 bis 50 μm . Selbst die strukturgebende Knorpellamelle (Bild B, 4) ist nicht dicker als 50 μm .

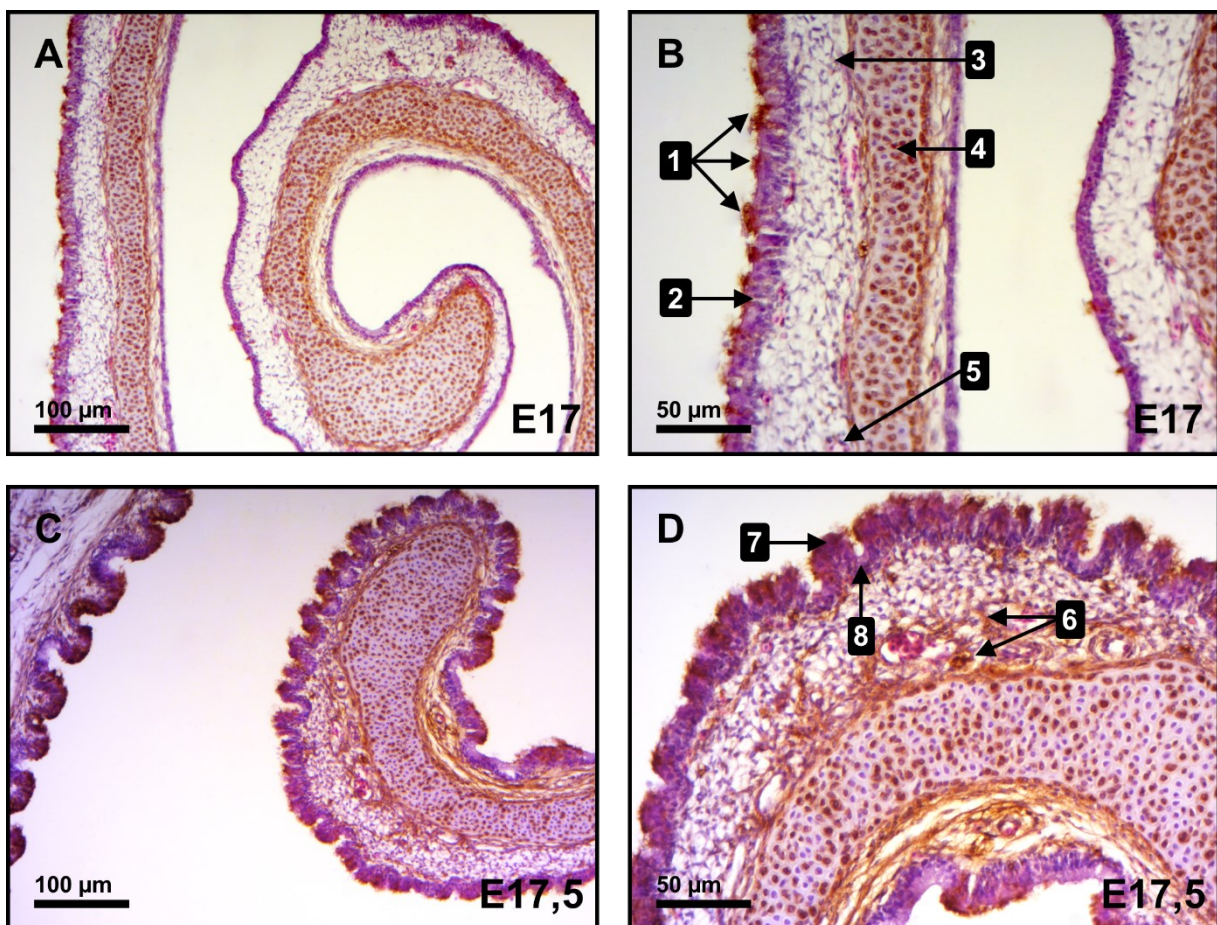


Abbildung 35: Immunofärbung/H&E - Concha nasalis media - E17 und E17,5

In der Abbildung 35 sind koronare Paraffinschnitte durch die Concha nasalis media mit einer Immunofärbung mit anti-ac-Tub-Ak und einer H&E Gegenfärbung der embryonalen Entwicklungstage 17 und 17,5 dargestellt. Die Bilder A und C, auf der linken Seite, sind Übersichtsaufnahmen. Die Bilder B und D sind Ausschnittsvergrößerungen. (1) Cluster von multiziliären Zellen, (2) mehrreihiges Flimmerepithel, (3) Lamina propria, (4) Knorpellamelle mit starker Immunreaktivität, (5) Blutgefäß, (6) Nervengewebe mit Immunreaktivität aufgrund des Vorhandenseins von acetyliertem-alpha-Tubulin, (7) Oberfläche mit Zilien, (8) Grund der Epithelfurche. Quelle: eigene Darstellung

Im Stadium E17,5 (Abbildung 35, Bild C und D) zeigt sich ein flächendeckender Besatz mit multiziliären Zellen. Die Epitheloberfläche ist im Vergleich zu den frühen Entwicklungsstadien

gefaltet. Die Epithelfurchen stellen sich regelmäßig und gleich tief im Epithelverband dar. Auf eine Besonderheit des Zilienbesatzes am Grund der Epithelfurchen im Vergleich zur Epitheloberfläche wird im Kapitel 4.1.6 näher eingegangen.

4.1.4 Nasenhöhlendach/Nasenseptum - Rasterelektronenmikroskopie

In den folgenden Abschnitten wird die embryonale Entwicklung des respiratorischen Epithels auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum (*Septum nasi*) in den Entwicklungsstadien E12 bis E18 mit der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Diese Areale werden im Folgenden aufgrund ihrer parallelen Epithelreifung als eine Einheit betrachtet. Der Schwerpunkt liegt auf der Beschreibung des zeitlichen und örtlichen Auftretens der verschiedenen Formen zilentragender Epithelzellen (Tabelle 3).

Stadium E12 und E13

Im Stadium E12 (Abbildung 36, Bild A) besitzen die meisten Epithelzellen im Zellverband ein kurzes Monozilium (Bild A, 1). Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium und multiziliäre Zellen sind nicht vorhanden. Die Epitheloberfläche ist größtenteils glatt aber auch stellenweise deutlich erhaben. Die Zellgrenzen sind partiell gegeneinander abgrenzbar.

Das Stadium E13 (Abbildung 36, Bild B) ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein vieler Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium (Bild B, 1) und bereits einzelner Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, welches noch nicht seine volle Länge ausgebildet hat (Bild B, 2). Die Erhabenheit der einzelnen Zellen hat im Vergleich zum Stadium E12 deutlich zugenommen. Dadurch lassen sich die einzelnen Zellen im Zellverband besser voneinander abgrenzen. Rarefiziert finden sich bereits einzelne unreife multiziliäre Zellen im Zellverband.

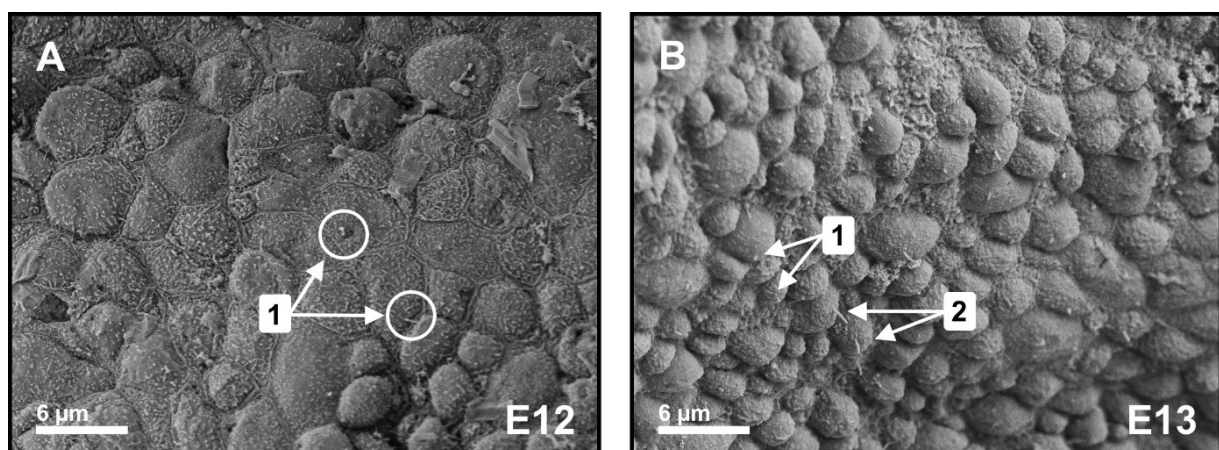


Abbildung 36: REM - Epithel des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums - E12/E13
In der Abbildung 36 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen des Nasenhöhlendach/Nasenseptums der embryonalen Entwicklungsstage 12 und 13 dargestellt. (1) Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium, (2) Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium. Die Erhabenheit der Zellen im Stadium E13 hat im Vergleich zum Stadium E12 deutlich zugenommen. (A) und (B) Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Stadium E14

Das Stadium E14 (Abbildung 37, Bild A und B) ist gekennzeichnet durch das gemeinsame Vorkommen von Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium (Bild A, 1), Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium (Bild B, 2), sowie unreifen multiziliären Zellen (Bild B, 3). Die Zellkonturen der embryonalen Epithelzellen sind vergleichbar mit dem Stadium E13. Zusätzlich weisen diese Epithelzellen einen höheren Besatz mit Mikrovilli auf.

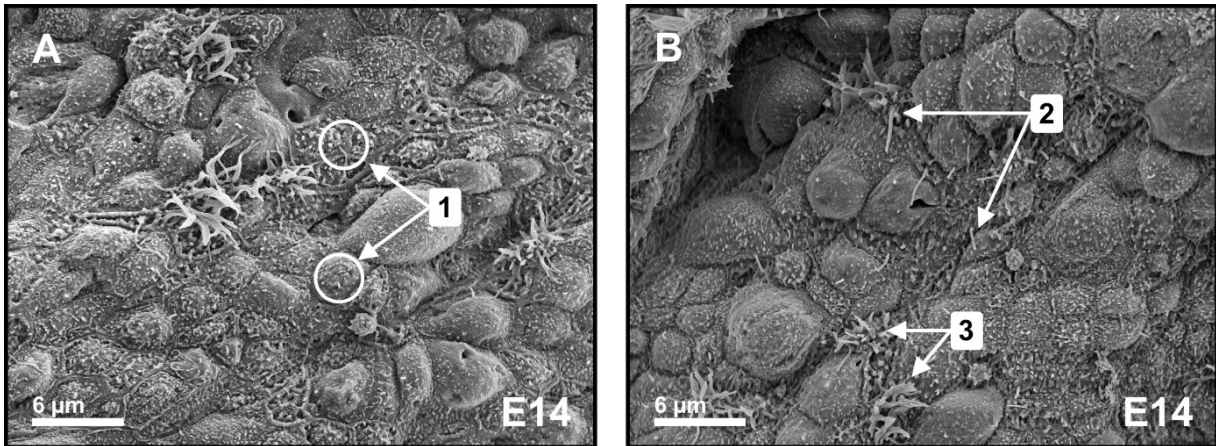


Abbildung 37: REM - Epithel des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums - E14
In der Abbildung 37 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen des Nasenhöhlendach/Nasenseptums des embryonalen Entwicklungstages 14 dargestellt. (1) Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium, (2) Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, (3) unreife multiziliäre Zellen. Die Zellerhabenheit ist mit dem Stadium E13 vergleichbar. (A) und (B) Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Stadium E14,5 und E15

Im Stadium E14,5 und E15 (Abbildung 38, Bild A und B) treten alle Formen von zilientragenden Epithelzellen nebeneinander auf. In beiden Stadien sind Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium (Bild A, 1) nur rarefiziert im Zellverband nachweisbar.

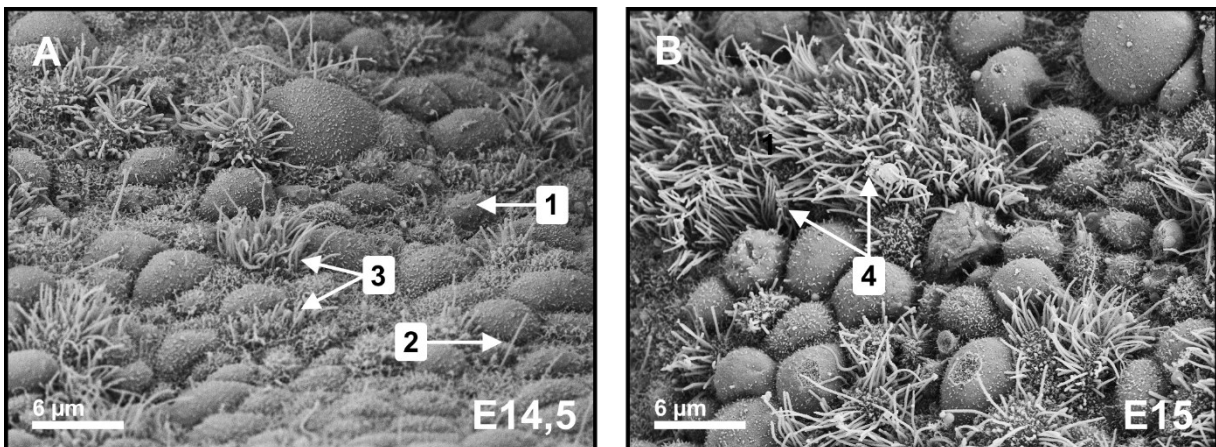


Abbildung 38: REM - Epithel des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums - E14,5/E15
In der Abbildung 38 sind REM Aufnahmen von Epithelzellen des Nasenhöhlendach/Nasenseptums der embryonalen Entwicklungstage 14,5 und 15 dargestellt. (1) Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium, (2) Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, (3) unreife multiziliäre Zellen, (4) reife multiziliäre Zellen. Die Erhabenheit hat im Stadium E15 im Vergleich zum Stadium E14,5 nochmals zugenommen. (A) und (B) Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Im Vergleich zum Stadium E14,5, in welchem reife multiziliäre Zellen nur rarefiziert nachweisbar sind, besitzt das Stadium E15 einen höheren Anteil an reifen multiziliären Zellen (Bild B, 4), welche sich bereits zu Zellclustern formieren. Die Zellerhabenheit im Stadium E15 hat im Vergleich zum Stadium E14,5 nochmals zugenommen. Einige Zellen nehmen dabei sogar eine halbkugelartige Form an.

Stadium E16 bis E18

Das Stadium E16 (Abbildung 39, Bild A, B und C) ist gekennzeichnet durch einen geschlossenen Zellverband von reifen multiziliären Zellen (Bild C, 1). Die embryonale Entwicklung des respiratorischen Epithels, in Bezug auf die Ausbildung von Zilien, ist abgeschlossen. Im Bild A ist ein Koronarschnitt durch die Nasenhöhle auf Höhe der Concha nasalis media dargestellt. Ein Ausschnitt des Nasenhöhlendaches mit dem angrenzenden Nasenseptum ist vergrößert in Bild B abgebildet.

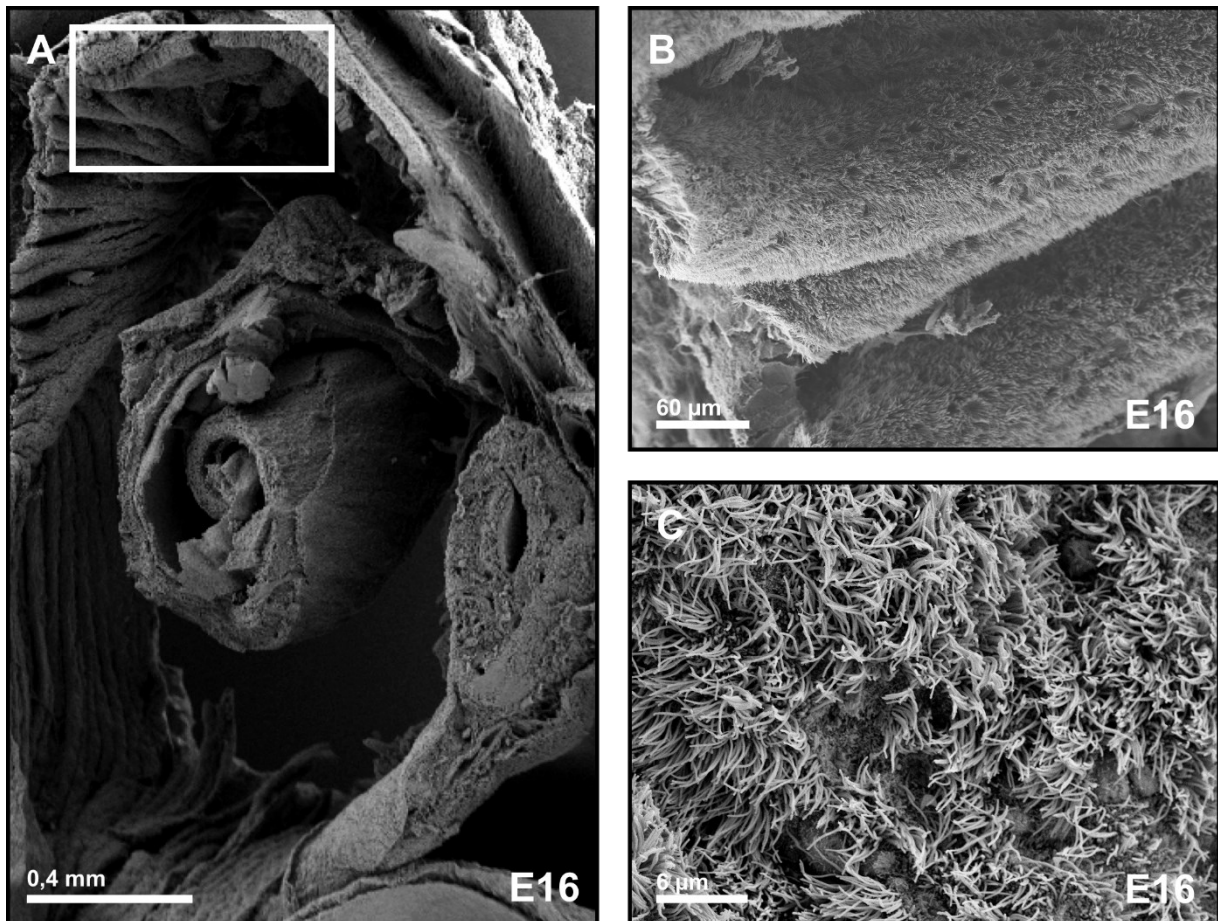


Abbildung 39: REM - Epithel vom Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E16

Im Bild A ist ein Koronarschnitt durch die linke Nasenhöhle auf Höhe der Concha nasalis media dargestellt (Nasenhöhlendach/Nasenseptum ist mit einem Rechteck markiert). Das Bild B ist eine Ausschnittsvergrößerung und zeigt tiefe regelmäßige Epithelfurchen. Das Bild C zeigt einen geschlossenen Zellverband von reifen multiziliären Zellen. **(B)** Vergr. 700 fach. **(C)** Vergr. 3000 fach
Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Neben dem flächendeckenden Besatz mit reifen multiziliären Zellen, ist der Zellverband durch regelmäßige tiefe Epithelfurchen gekennzeichnet. Elektronenmikroskopisch ist kein Unterschied zwischen den Stadien E16, E17 und E18 ersichtlich, da bereits im E16 ein geschlossener Zellverband aus reifen multiziliären Zellen nachweisbar ist.

Die Tabelle 5 ist eine zusammenfassende Darstellung des Vorkommens der definierten Formen von zilientragenden Epithelzellen in den Stadien E12 bis E18 auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum. In dieser Tabelle ist das Vorkommen dieser Zellarten pro Entwicklungsstadium in Analogie zur Tabelle 4 jeweils mit einem Pluszeichen „+“, einem Minuszeichen „-“ oder einem Pluszeichen in Klammern „(+“ visuell dargestellt.

Embryonaler Entwicklungsstag (E)	E12	E13	E14	E14,5	E15	E16	E17	E18
Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium	-	(+)	+	+	+	-	-	-
unreife multiziliäre Zellen	-	(+)	+	+	+	-	-	-
reife multiziliäre Zellen	-	-	-	(+)	+	+	+	+

Tabelle 5: Vorkommen monoziärer/multiziliärer Zellen dem Nasenhöhlendach/Nasenseptum, Untersuchungsstadien E12 bis E18; - kein Vorkommen dieser Zellen, (+) rarefiziertes Vorkommen dieser Zellen = vereinzelt Vorkommen dieser Zellart ohne Clusterbildung, + Vorkommen dieser Zellen = Nachweis dieser Zellart im Zellverband mit gehäuftem Auftreten in Zellclustern unterschiedlicher Größe; Quelle: eigene Darstellung

4.1.5 Nasenhöhlendach/Nasenseptum - Immunofärbung

In den folgenden Abschnitten wird die Entwicklung des respiratorischen Epithels vom Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum in den Entwicklungsstadien E12 bis E17 in Bezug auf das Auftreten von multiziliären Zellen anhand der Immunofärbung an Paraffinschnitten beschrieben. Die in diesem Kapitel bearbeitete Untersuchungsregion ist in der Abbildung 32 (Übersichtsaufnahme, 2) im Koronarschnitt dargestellt. In den folgenden Abbildungen werden in der linken Spalte jeweils das Nasenhöhlendach oberhalb der Concha nasalis media und rechts daneben das angrenzende Nasenseptum pro Entwicklungsstadium nebeneinander dargestellt.

Stadium E12 und E13

In den Stadien E12 und E13 (Abbildung 40, Bild A bis D) ist auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum noch keine spezifische Immunreaktivität (Braunfärbung) auf der Epitheloberfläche des respiratorischen Epithels zu erkennen (Bild A bis D, 1).

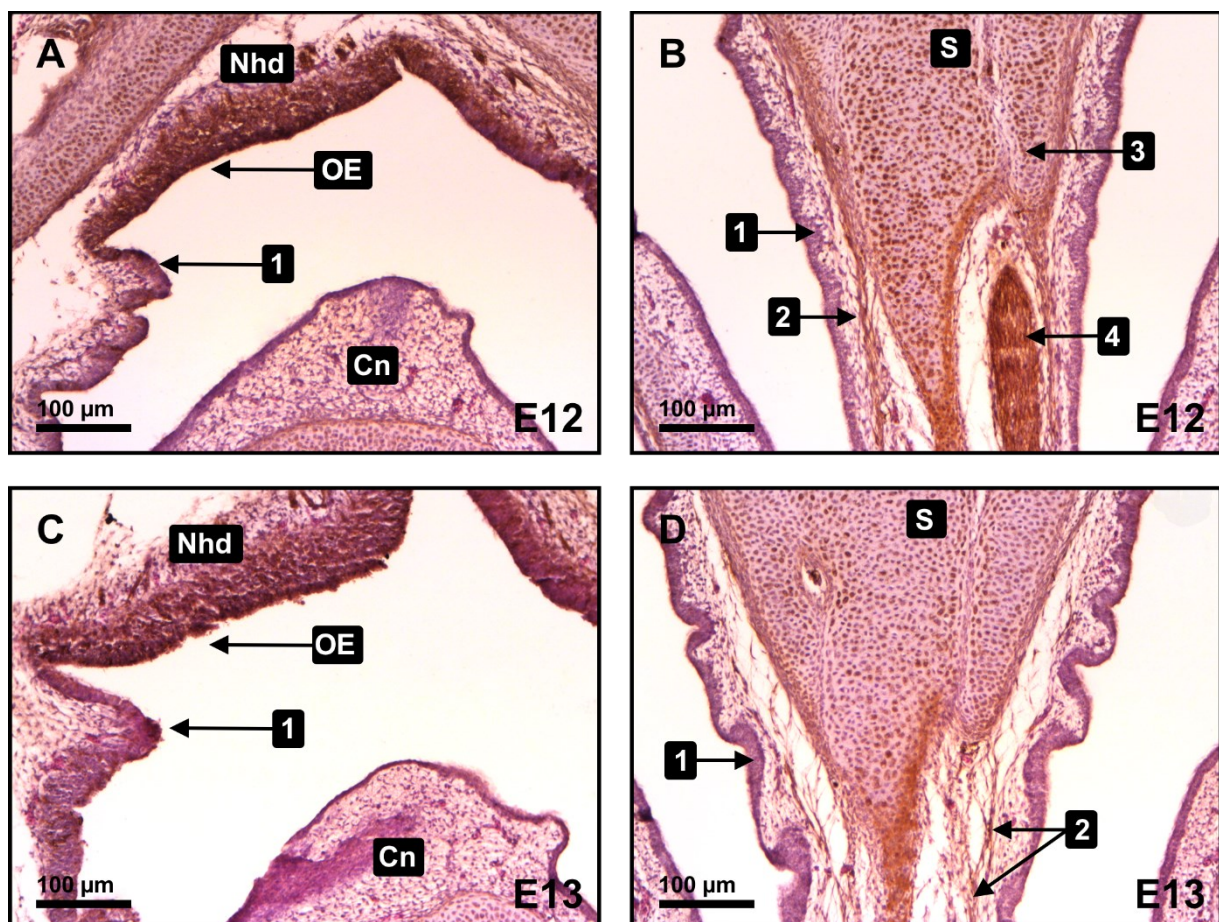


Abbildung 40: Immunofärbung/H&E - Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E12/E13

(OE) olfaktorisches Epithel, (Cn) Concha nasalis media, (Nhd) Nasenhöhlendach, (S) Nasenseptum, (1) respiratorisches Epithel, (2) Bindegewebsschicht mit Nervenfasern, (3) Knorpellamelle, (4) Ast des Nervus maxillaris. Viele endogene Peroxidasen in den Nervenfasern sowie dem olfaktorischen Epithel führen zu einer kräftigen Immunreaktivität. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Im Vergleich dazu, zeigt das olfaktorische Epithel (Bild A und C, OE), der angeschnittenen Concha nasalis caudalis, bereits in diesen Stadien eine Immunreaktivität. Auffallend ist zusätzlich die größere Epitheldicke von bis zu 50 μm des olfaktorischen Epithels im Vergleich zum respiratorischen Epithel mit einer Epitheldicke von circa 15 μm . Das Nasenseptum ist jeweils an dem außenliegenden respiratorischen Epithel (Bild B und D, 1), der darunterliegenden Bindegewebsschicht mit den enthaltenden Nervenfasern (Bild B und D, 2) bzw. eines Astes des Nervus maxillaris (Bild B, 4) und der strukturgebenden Knorpellamelle (Bild B, 3) erkennbar. Auch die neuronalen Fasern zeigen eine deutliche immunzytochemische Anfärbung mit dem Antikörper.

Stadium E14 und E15

Im Stadium E14 (Abbildung 41, Bild A und B) sind erste immunreaktive Cluster von multiziliären Zellen (Bild A und B, 1), sowohl auf dem Nasenhöhlendach als auch auf dem angrenzenden Nasenseptum zu erkennen. Ein flächendeckender Besatz mit multiziliären Zellen liegt noch nicht vor. Das respiratorische Epithel imponiert vorwiegend mehrreihig.

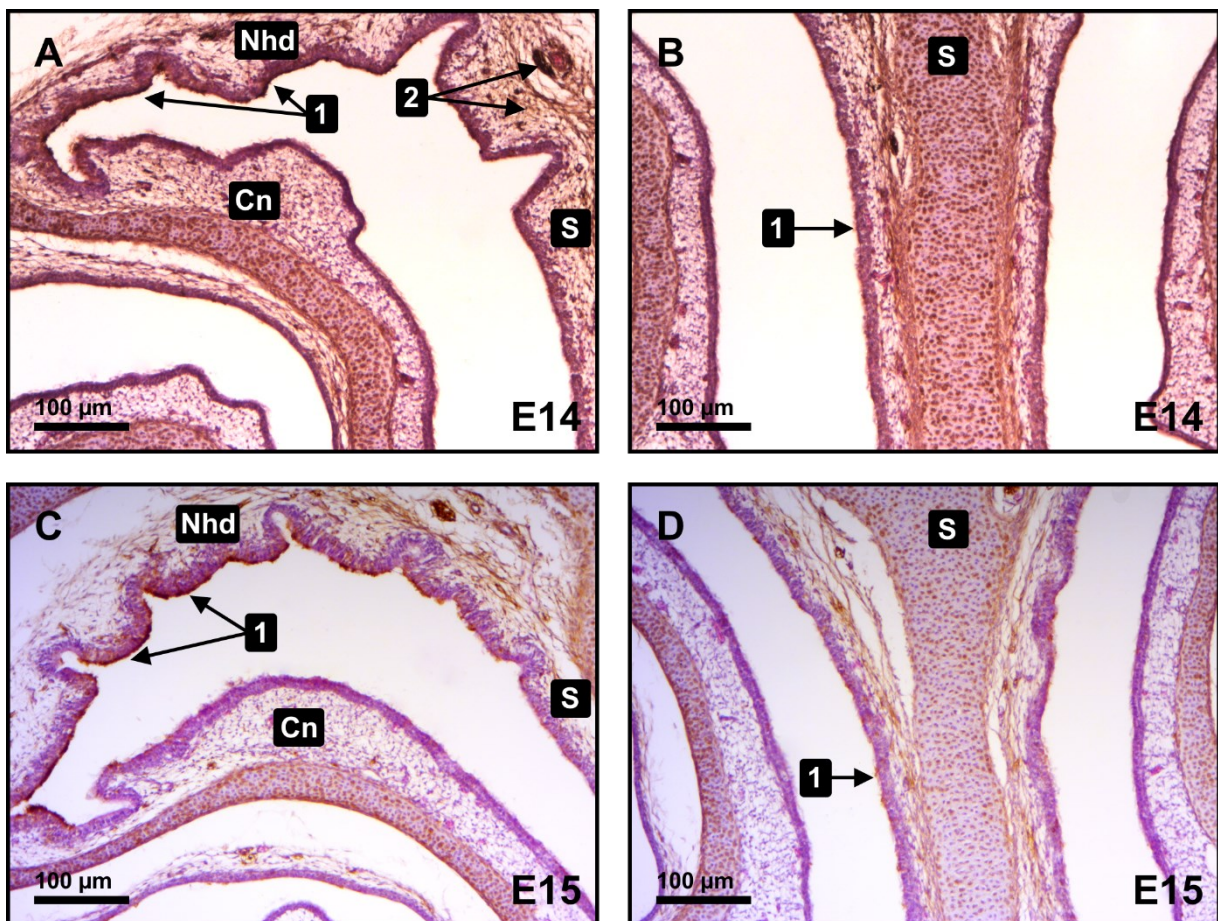


Abbildung 41: Immunofärbung/H&E - Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E14/E15
(1) respiratorisches Epithel, (2) Bindegewebsschicht mit Nervenfasern, (Cn) Concha nasalis media, (Nhd) Nasenhöhlendach, (S) Nasenseptum. Im Stadium E14 und E15 sind Cluster von multiziliären Zellen auf dem Nasenhöhlendach und dem Nasenseptum erkennbar. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

Im Stadium E15 (Abbildung 41, Bild C und D) lässt sich eine starke Zunahme der Immunreaktivität (Braunfärbung) des Flimmerepithels in beiden Lokalisationen feststellen (Bild C und D, 1). Bis auf wenige kleine Areale findet sich ein flächendeckender Besatz mit multiziliären Zellen. Einzelne Epithelfurchen sind bereits voll ausgebildet.

Stadium E16 und E17

Die Stadien E16 und E17 (Abbildung 42, Bild A bis D) sind gekennzeichnet durch einen flächendeckenden Besatz mit multiziliären Zellen (Bild A bis D, 1). Im Stadium E17 stellen sich die Epithelfurchen in beiden Lokalisationen regelmäßig und ähnlich tief ausgeprägt dar.

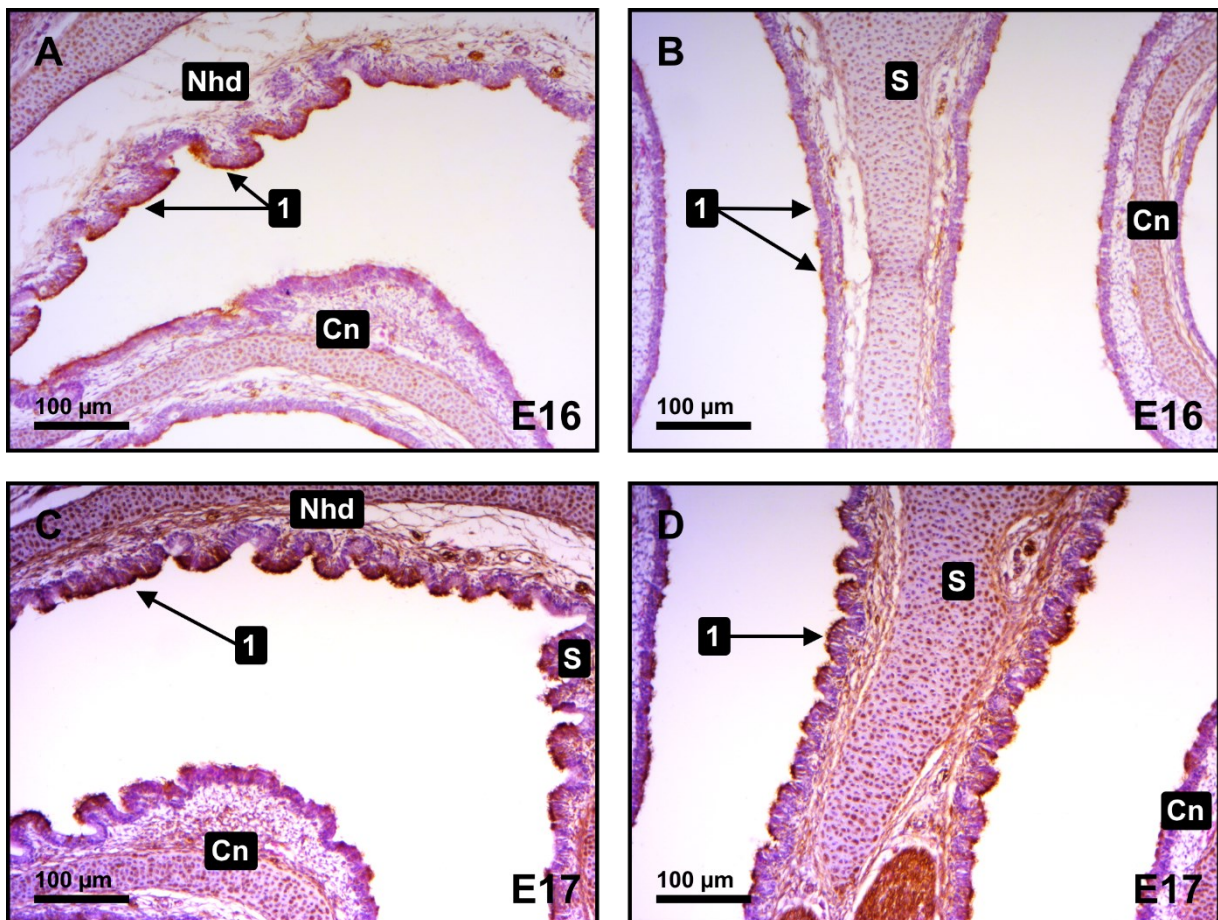


Abbildung 42: Immunofärbung/H&E – Nasenhöhlendach/Nasenseptum - E16/E17
(1) respiratorisches Epithel, (Cn) Concha nasalis media, (Nhd) Nasenhöhlendach, (S) Nasenseptum. Ab dem Stadium E16 findet sich ein flächendeckender Besatz mit multiziliären Zellen mit der Ausbildung von tiefen regelmäßigen Epithelfurchen. Quelle: eigene Darstellung

Wie in der Abbildung 42 im Bild A und C erkennbar, gibt es eine Besonderheit in Bezug auf den Besatz mit multiziliären Zellen am Grund der Epithelfurchen. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

4.1.6 Besonderheiten der Epithelfurchen

In einer früheren Dissertation am EMZ Rostock (Reinke 2022) wurde entdeckt, dass es am Grund der tiefen Epithelfurchen des respiratorischen Epithels der Trachea des Haushuhns zu einem verringertem Wachstum von multiziliären Zellen kommt. In den Epithelfurchen lassen sich Epithelzellen nachweisen, welche an ihrer Oberfläche keine Zilien ausbilden. In diesem Kapitel wird der Fragestellung nachgegangen, ob auch im Bereich des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle an den zwei untersuchten Lokalisationen dieses Phänomen vorkommt. Im Rahmen der Entwicklung des respiratorischen Epithels kommt es zur Entstehung von reifen multiziliären Zellen und gleichzeitig zu einer Faltung des Epithels mit Bildung von Epithelfurchen. Wie in den vorherigen Kapiteln erläutert, ist dieser Prozess in der Nasenhöhle an den untersuchten Lokalisationen konstant nachweisbar. Während der systematischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse in den späten Stadien der Entwicklung, zeigte sich auch im Bereich der Nasenhöhle ein Unterschied in der Ausbildung von zilienträgenden Epithelzellen, zwischen dem Grund der Epithelfurchen und der Oberfläche des respiratorischen Epithels.

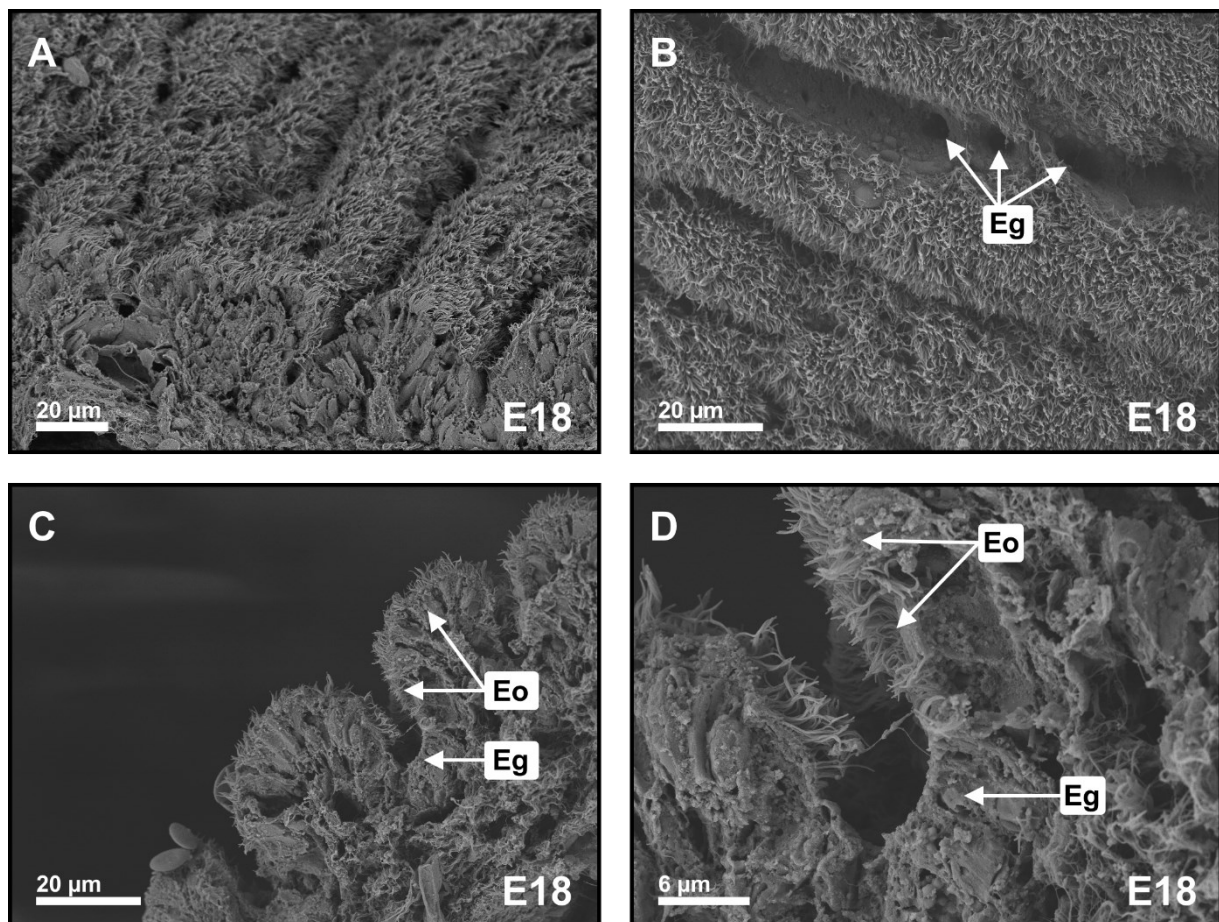


Abbildung 43: REM - Epithelfurchen der Regio respiratoria - E18
(**Eo**) Epitheloberfläche der Epithelfurchen, (**Eg**) Epithelgrund der Epithelfurchen. Bild C und D: koronare Schnitte an Bruchkanten erlauben die vollständige Einsicht der Epithelfurchen. (**A**) Vergr. 700 fach. (**B** und **C**) Vergr. 1000 fach. (**D**) Vergr. 3000 fach. Quelle: eigene Darstellung

Ergebnisse

In der Abbildung 43 sind die Epithelfurchen des respiratorischen Epithels der Concha nasalis media im Stadium E18 in verschiedenen Vergrößerungen und Ansichten dargestellt.

Im Bild A zeigt eine seitliche Aufsicht auf ein vollständig ausgebildetes respiratorisches Epithel mit einem flächendeckenden Besatz mit reifen multiziliären Zellen und tiefen, regelmäßigen parallel verlaufenden Epithelfurchen. Im Bild B ist der Grund einer Epithelfurche in horizontaler Ausrichtung vollständig einsehbar. Während an der Oberfläche der Epithelfurchen ein geschlossener Epithelverband von reifen multiziliären Zellen nachweisbar ist, besitzen die Epithelzellen am Grund der Epithelfurchen keine Zilien. In den Bildern C und D sind koronare Querschnitte durch die Epithelfurchen dargestellt. Diese Ansichten erlauben die exakte Beurteilung des Zilienbesatzes der Innenwände der Epithelfurche bis zum Furchengrund. An der Epitheloberfläche und an oberen Bereichen der Innenwände der Epithelfurchen (Bild C und D, Eo) sind reife multiziliäre Zellen nachweisbar. Am Grund der Epithelfurchen (Bild C und D, Eg), zeigen sich respiratorische Epithelzellen, welche auf ihrer Oberfläche keine Zilien tragen. Diese Gegebenheiten lassen sich auch entsprechend mit Hilfe der Immunofärbung darstellen. In der Abbildung 44 sind Epithelfurchen des Nasenseptums nach Anfärbung mit dem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin in den Stadien E15 und E17 dargestellt. Analog der rasterelektronenmikroskopischen Charakterisierung im Bereich der Concha nasalis media, zeigt sich auch im Bereich des Nasenseptums, dass am Grund der Epithelfurchen selektiv keine zilientragenden Epithelzellen vorkommen (Bild A und B, Eg). Die Oberfläche und der obere Innenrand der Epithelfurchen (Bild A und B, Eo) sind im Gegensatz dazu mit zilientragenden Epithelzellen ausgekleidet.

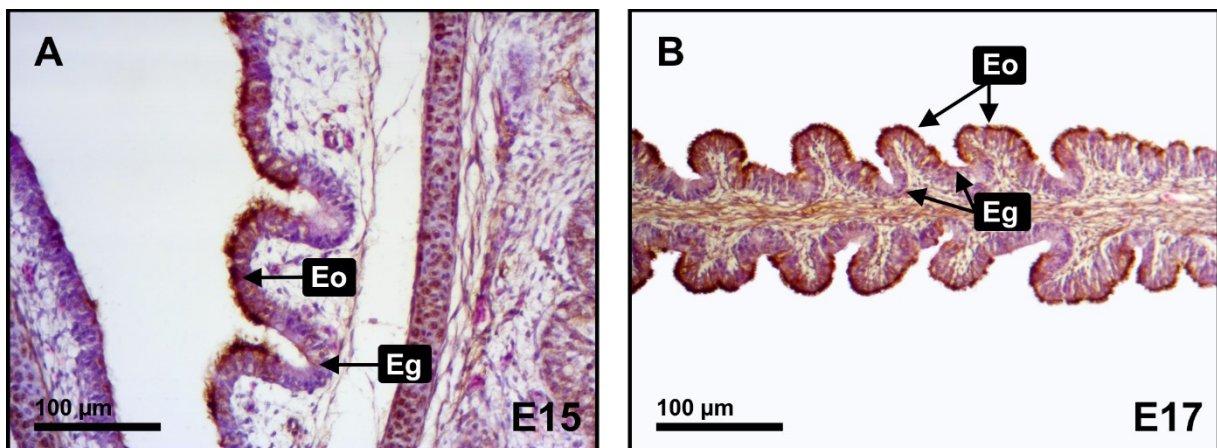


Abbildung 44: Immunofärbung/H&E - Epithelfurchen des Nasenseptums - E15/E17

(Eg) Epithelfurchengrund, Epithelzellen ohne Zilien, (Eo) Oberfläche der Epithelfurchen, multiziliäre Zellen. Quelle: eigene Darstellung

In der Abbildung 45 sind Immunfärbungen mit höheren Vergrößerungen, zur genaueren Analyse der Epithelzellen am Furchengrund dargestellt. Die Epithelzellen am Grund der Epithelfurchen imponieren als hochprismatische Zellen mit einem basal gelegenen Nucleus (Bild A bis F, 1), besitzen ein apikales eosinophiles Zytoplasma, das durch Sekretionsgranula geprägt

Ergebnisse

ist (Bild A bis F, 2) und tragen keine Zilien an ihrer Oberfläche. Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass an den zwei untersuchten Lokalisationen in der Nasenhöhle derselbe Aspekt in Bezug auf die Ausprägung zilentragender Epithelzellen am Grund der Epithelfurchen zu beobachten ist.

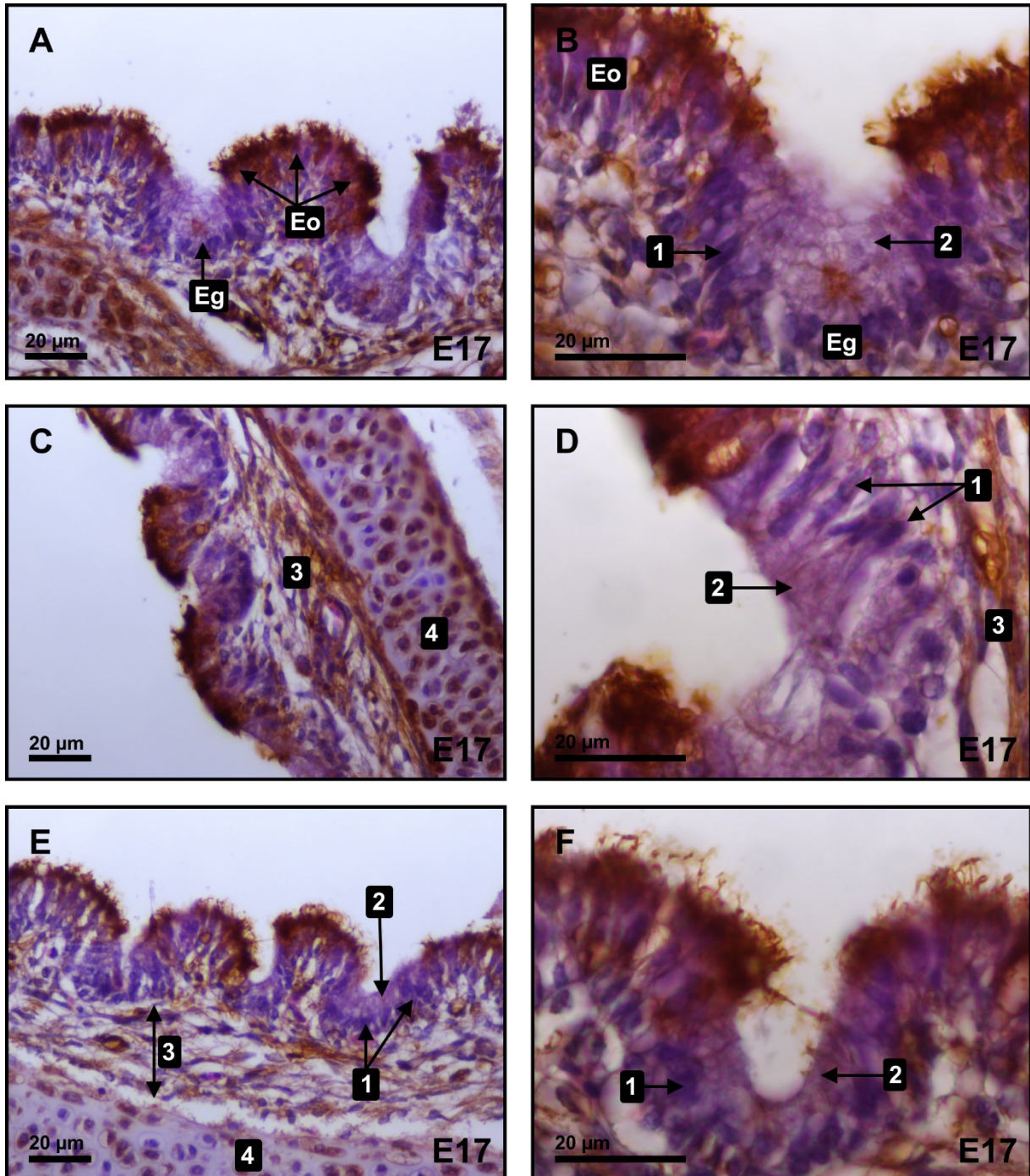


Abbildung 45: Immunofärbung/H&E - Epithelfurchen - E17

Die Bilder A, C und E, auf der linken Seite, sind Übersichtsaufnahmen. Die Bilder B, D und F sind Ausschnittsvergrößerungen. **(Eo)** Epitheloberfläche der Furche mit zilentragenden Zellen, **(Eg)** Epithelfurchengrund mit zilentlosen Zellen, **(1)** basal gelegener Nucleus einer hochprismatischen zilentlosen Zelle, **(2)** apikales eosinophiles Zytoplasma einer hochprismatischen zilentlosen Zelle, **(3)** Lamina propria mit Basalmembran, **(4)** Knorpellamelle, Chondrozyten mit umgebender Matrix und Perichondrium (Perichondrium und einzelne Chondrozyten färben sich kräftig braun an, hoher Gehalt an endogenen Peroxidasen). Quelle: eigene Darstellung

4.1.7 Vergleich der Epithelentwicklung in der Nasenhöhle

Im folgenden Abschnitt werden zusammenfassend die Ergebnisse der beiden Untersuchungslokalisationen gegenübergestellt. Dies ermöglicht den direkten Vergleich des zeitlichen Auftretens der verschiedenen Formen ziliotragender Epithelzellen während der embryonalen Entwicklung. Zur besseren Übersicht erfolgt die Darstellung in tabellarischer Form (Tabelle 6).

	Concha nasalis media	Nasenhöhldach/Nasenseptum
Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium	E12	E12
Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium	E14,5	E13
Unreife multiziliäre Zellen	E14,5	E13
flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen	E18	E16

Tabelle 6: Vergleich zeitlicher Verlauf der Epithelentwicklung zwischen Concha nasalis media vs. Nasenseptum/Nasenhöhldach

An beiden Untersuchungslokalisationen sind bereits im Stadium E12 Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium im Zellverband nachweisbar. Der direkte Vergleich zeigt, dass auf dem Nasenhöhldach mit dem angrenzenden Nasenseptum Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium 1,5 Tage früher nachgewiesen werden können als auf der Concha nasalis media. Dieser Trend zeigt sich auch im Hinblick auf das erste Auftreten von unreifen multiziliären Zellen. Ein flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen ist auf dem Nasenhöhldach/Nasenseptum circa zwei Tage früher, bereits im Stadium E16, als auf der Concha nasalis media nachweisbar. Auf der Concha nasalis media ist ein flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen erst im Stadium E17,5 bis E18 vorhanden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Prozess von der Bildung erster Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium bis zu einer Ausprägung eines flächendeckenden Besatzes mit multiziliären Zellen an beiden Untersuchungslokalisationen, trotz des unterschiedlichen Beginns, einen Zeitraum von 3,5 bis 4 Tagen einnimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich um eine typische Abfolge im Rahmen eines definierten Entwicklungsprozesses handelt.

5. Diskussion

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der embryonalen Entwicklung des respiratorischen Flimmerepithels im Bereich der Nasenhöhle, an den Lokalisationen der Concha nasalis media, sowie dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum, im Haushuhn (var. White Leghorn). Für die Analysen wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der Epithelmorphologie in Kombination mit immunzytochemischen Nachweisen des Zilienmarkers acetyliertes Tubulin und histologischen H&E Färbungen auf Paraffinschnitten eingesetzt.

5.1 Diskussion der Materialien und Methoden

5.1.1 Verwendung des Haushuhns als Modellorganismus

Zur embryonalen Forschung werden in der Literatur unterschiedliche Modellorganismen verwendet. Zu den häufig untersuchten Organismen zählen unter anderem: der Frosch (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*), die Hausmaus (*Mus musculus*), das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) und der Zebrafisch (*Danio rerio*) (Wheeler und Brändli 2009). Für die Untersuchungen des embryonalen respiratorischen Epithels wurden in der Literatur bisher unter anderem folgende Modellorganismen verwendet. Dazu zählen die Säugetiere Kaninchen (Kanda und Hilding 1968; Loots und Nel 1989) und Ratte (Menco und Farbman 1987) sowie die Vogelart Huhn, mit unterschiedlichen Varietäten (Rhode Island Red, White Leghorn domestic fowl) (Walsh und McLelland 1978; Fauziah et al. 2003). In den folgenden Absätzen werden die Vor- und Nachteile des verwendeten Modellorganismus des Haushuhns für die Untersuchung des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle erläutert und mit den in der Literatur verwendeten Organismen Ratte und Kaninchen verglichen.

Ein Vorteil des Haushuhns ist die Tatsache, dass die Bebrütung der Embryonen im Ei erfolgt. Im Gegensatz zu den Säugetieren ermöglicht dies eine punktgenaue Entnahme der Eier aus dem Inkubator und somit eine Zuordnung zur embryonalen Phase. Für Hühnerembryonen gibt es, wie bereits in der Einleitung beschrieben, eine validierte Korrelation zwischen der Großzehenlänge und ihrem embryonalen Entwicklungstag (Hamburger und Hamilton 1992). Zusätzlich zur korrekten Entnahme der Eier aus dem Brutapparat dient dies als Qualitätskontrolle. Ein weiterer Vorteil liegt in der kurzen embryonalen Entwicklungszeit der Hühnerembryonen von 21 Tagen, wobei in dieser Dissertation die Entwicklungstage E12 bis E18 untersucht wurden (7 Tage). Eine gezielte Entnahme der Hühnereier aus dem Brutapparat mit Wendeautomatik ist stundengenau möglich. Auch die Entnahme an halben Entwicklungstagen (z.B. E14,5) ist problemlos realisierbar.

Im Vergleich dazu, hat auch das Säugetier Ratte eine kurze Gestationsdauer von 21 bis 23 Tagen. Jedoch werden zur Untersuchung dieser Embryonen die Muttertiere getötet, um anschließend die Embryonen zu entnehmen (Menco und Farbman 1987). Das Kaninchen hat zusätzlich zu diesem negativen Aspekt noch eine längere Gestationsdauer von 31 Tagen (Fischer et al. 2012). Ein weiterer Vorteil von Hühnerembryonen im Vergleich zu anderen Modellorganismen liegt in der bekannten Korrelation zwischen der humanen embryonalen Entwicklung und der embryonalen Entwicklung der Hühner (Bjørnstad et al. 2015). Das Haushuhn wird zur Forschung im Bereich der Nasenhöhle ebenfalls zur Untersuchung des olfaktorischen Epithels verwendet (Hogan et al. 2020). Der Nachteil von Hühnerembryonen für Untersuchungen im Bereich der Conchae nasales liegt in der geringen Größe der gesamten Zielstruktur der Nasenhöhle. So beträgt die rostrokaudale Ausdehnung der Nasenhöhle im Stadium E13 circa 0,4 cm und im Stadium E18 0,9 cm. Die Breite der Nasenhöhle in diesen Stadien liegt zwischen 0,4 cm bis 1 cm. In der Literatur werden für die Klassifikation der drei Conchae nasales des Haushuhns verschiedene Nomenklaturen verwendet. Die Concha nasalis media wird auch als Concha nasalis ventralis und die Concha nasalis caudalis wird auch als Concha nasalis dorsalis bezeichnet. Ebenso zählt in der Literatur die Concha nasalis rostralis teilweise nicht als Conche (Casteleyn et al. 2018).

5.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ist eine Methode, welche seit Jahrzehnten zur Untersuchung von Zilien im Bereich des respiratorischen Epithels verwendet wird (Fauziah et al. 2003).

Im folgenden Absatz werden die Schritte der REM-Probenverarbeitung und der Bildaufnahme diskutiert. Da es in der Literatur keine spezifischen Protokolle für die Präparation der Conchae nasales des Haushuhns für die REM Untersuchung gibt, mussten diese Arbeitsschritte erst entwickelt und optimiert werden. Um die feinsten Zielstrukturen der Zilien darzustellen, ist eine vorsichtige Spülung der Probenoberfläche mit PBS notwendig, um Blutbestandteile und Sekrete von der Epitheloberfläche zu entfernen. Da zum Untersuchungszeitpunkt keine Schnittvorrichtung für embryonale Hühnerköpfe zur Verfügung stand, wurde ein Schnittblock verwendet, welcher zur Erstellung von Koronarschnitten des Rattengehirns benutzt wird. Dies ermöglicht eine reproduzierbare Schnittführung und kann somit für weitere Untersuchungen im Bereich der Nasenhöhle des Haushuhns empfohlen werden. Dadurch war es möglich, bereits in einem Alter von E12 Koronarschnitte der Conchae nasales, welche in diesem Alter eine rostrokaudale Ausdehnung von ca. 0,4 cm haben, zu erstellen. In der Literatur wurden diese Untersuchungen aufgrund der geringen Größe erst ab einem Alter von E15 beschrieben (Fauziah et al. 2003). Koronarschnitte müssen aus Stabilitätsgründen im Gesamten getrocknet und untersucht werden. Aufgrund der geringen Größe und der Vulnerabilität embryonaler Struktu-

ren ist eine gezielte Entnahme der Concha nasalis media problematisch, ohne, dass das embryonale respiratorische Epithel beschädigt wird. Aus diesem Grund ist der weiter zu verarbeitende Koronarschnitt deutlich größer als der eigentliche Zielbereich. Dies bedingt unter anderem eine längere Verweildauer im Aceton sowie eine Verlängerung der Besputterungszeit. Zusätzlich ist die Concha nasalis media eine komplexe dreidimensionale Struktur. Aus diesem Grund ergeben sich komplizierte morphologische Verhältnisse mit wenig ebenen Oberflächen, welche für die REM Untersuchung ideal sind. Bei komplexen 3D Strukturen, wie der Concha nasalis media, sind Aufladungsartefakte, aufgrund ungleicher Besputterung (ungleiche Goldschichtdicke) häufiger als auf planen Oberflächen. Aufnahmen aus der Tiefe der Conchae nasales werden aufgrund hoher Probenränder erschwert. Der Vorteil der Methode REM liegt in der Möglichkeit Bilder mit Vergrößerungen bis zu 100.000x zu erstellen, welche die Zilienmorphologie und die Zelloberfläche exakt darstellen. Dazu besteht die Möglichkeit Übersichtsaufnahmen der Nasenhöhle zu erstellen. Dies ermöglicht eine gezielte Vergrößerung spezieller Untersuchungsregionen und damit den direkten Vergleich zwischen der Concha nasalis media und dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum. Eine weitere Methode, welche zunehmend für die 3D bildmorphologische Darstellung der Nasenhöhle in der Forschung verwendet wird, ist die Mikro-Computertomographie (Hogan et al. 2020). Sie ist ein nützliches Instrument für Untersuchungen im Bereich der Entwicklungsbiologie (Metscher 2009).

5.1.3 Immunofärbung und H&E Färbung

Der Primärantikörper gegen acetyliertes-alpha-Tubulin, ist ein bekannter diagnostischer Marker zur Anfärbung von Zilien an der Oberfläche des respiratorischen Epithels und wird sowohl bei der Immunfluoreszenz (Jain et al. 2010) als auch bei der Immunofärbung verwendet. In dieser Dissertation wurde die Immunofärbung mit anti-ac-Tub-Ak erstmals auch für die Untersuchung von Zilien im Bereich der Concha nasalis media und am Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum am embryonalen Haushuhn etabliert. Im folgenden Abschnitt werden Besonderheiten bei der Durchführung der Immunofärbung mit anti-ac-Tub-Ak im Bereich der Nasenhöhle diskutiert. Die Dicke der Paraffinschnitte hat einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der anschließenden Immunofärbung. In der Pathologie wird empfohlen, an klinisch reifen Gewebeproben, Paraffinschnitte mit einer Dicke von 4-8 µm durchzuführen (Firth et al. 2014; Kim et al. 2016). Dickere Paraffinschnitte können zu einem stärkeren Hintergrundsignal (engl. background) führen (Kim et al. 2016). In dieser Dissertation wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Diese 10 µm dicken Paraffinschnitte von embryonalem Gewebe sind stabiler, besser handhabbar im Hinblick auf die Übertragbarkeit auf den Objektträger und ermöglichen somit eine reproduzierbare gleichbleibende Qualität. Trotz dieser gewählten Schnittdicke konnte ein höheres Hintergrundsignal, als bei 5-8 µm Schnitten, mit der Immunofärbung im Bereich der Nasenhöhle, nicht festgestellt werden.

Diskussion

Ein weiterer diskutierbarer Aspekt bei der Durchführung der Immunofärbung mit DAB, ist die verwendete Konzentration des H_2O_2 , um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Wie im Methodenteil bereits beschrieben, muss vor der Zugabe des DAB die endogene Peroxidase des untersuchten Gewebes irreversibel gehemmt werden, da es sonst zu einem falsch positiven Farbumschlag bei der Immunofärbung kommt. In der Literatur werden Konzentrationen von 0,3% bis 3% H_2O_2 , je nach Verwendungszweck, angewandt (Radulescu und Boenisch 2007). In dieser Dissertation wird eine Konzentration von 0,3% H_2O_2 verwendet, da embryonales Gewebe sehr vulnerabel ist und eine Konzentration von 3% zur Zerstörung von Mikrostrukturen an der Epitheloberfläche, aufgrund der verstärkten Blasenbildung, führen kann. Die verwendete H_2O_2 Konzentration von 0,3% führte einerseits zu einer stärkeren Kontrastierung der Chondrozyten und Fibroblasten, hatte andererseits aber auf die untersuchte Zielstruktur des Flimmerepithels keine Auswirkungen. In der Literatur werden als spezifische Primärantikörper zur Markierung von motilen Zilien unter anderem Antikörper gegen acetyliertes-alpha-Tubulin, beta 4 Tubulin und IFT88 (intraflagellar transport protein 88) beschrieben. Zur Markierung von Primärzilien und Basalkörpern werden Antikörper gegen ARL13B (small ciliary G protein of the Ras superfamily) und gamma-Tubulin verwendet (Seo et al. 2011), welche allerdings nicht ausschließlich Primärzilien anfärben. In dieser Dissertation wurde der Primärantikörper gegen acetyliertes-alpha-Tubulin benutzt, um eine Vergleichbarkeit mit früheren Untersuchungen am respiratorischen Epithel unterschiedlicher Versuchstiere zu ermöglichen. Da es in der Literatur für das respiratorische Epithel der Nasenhöhle des embryonalen Haushuhns keine konkreten Angaben zur idealen Konzentration des Primärantikörpers gab, musste eine Verdünnungsreihe erstellt werden. Nach Testung verschiedener Verdünnungen des Primärantikörpers im Blockpuffer mit 1:2000, 1:4000, 1:5000, 1:8000, 1:10.000, 1:20.000, stellte sich heraus, dass 1:10.000 die beste Verdünnung für die Darstellung von Zilien im Bereich der Nasenhöhle ist. Frühere institutsinterne Untersuchungen des respiratorischen Epithels im Bereich der Trachea wurden mit der Methode der Immunofluoreszenz mit anti-ac-Tub-Ak einer Verdünnung von 1:1000 durchgeführt (Reinke 2022). Der Nachteil der Immunofluoreszenz im Gegensatz zur Immunofärbung, bei komplexen 3D Zielstrukturen, wie der Nasenhöhle mit den Conchae nasales, ist die ungenaue Zuordnung der fluoreszierenden Bereiche zu ihren anatomischen Strukturen. Eine Vergleichbarkeit zwischen der Concha nasalis media und dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum ist mit der Immunofärbung und der verwendeten Gegenfärbung mit H&E besser zu realisieren. Die mit der Gegenfärbung H&E dargestellten anatomischen Strukturen ermöglichten eine exakte Zuordnung der braungefärbten Epitheloberfläche zur Concha nasalis media und zum Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Entwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle

Während der embryonalen Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle kommt es zur Ausbildung verschiedener Formen zilientragender Epithelzellen im Zellverband. Um eine standardisierte Beschreibung der Epitheloberfläche mittels der REM Untersuchung während der Entwicklung des Epithels zu ermöglichen, wurde in dieser Dissertation eine Nomenklatur zur Beschreibung zilientragender Epithelzellen eingeführt. Die Klassifikation erfolgt anhand der Zilienlänge, der Anzahl der vorhandenen Zilien auf der Epithelzelloberfläche, dem Mikrovillibesatz, sowie der Zellerhabenheit. In der Literatur existiert bisher keine allgemein verwendete Nomenklatur zur Beschreibung von zilientragenden Zellen. So wird das Zilium einer monoziliären Zelle als primäres Zilium und die Zilien einer multiziliären Zelle als sekundäre Zilien bezeichnet (Menco und Farbman 1987). Eine weitere Arbeit verwendet Begriffe wie zum Beispiel: „vorwiegend Mikrovilli tragende Zellen mit oder ohne Zilien“, „Cluster von sich entwickelnden ziliären Zellen“ oder „mature ziliäre Zellen“ (Fauziah et al. 2003). Die rein deskriptive Beschreibung des Zellverbandes erlaubt die Einteilung der Epithelzellen in Zellen mit einem Monozilium an der Oberfläche und Epithelzellen welche multiple Zilien (multiziliäre Zelle) ausbilden. Wie in Tabelle 3 beschrieben, ergeben sich 4 verschiedene Formen zilientragender Epithelzellen. Diese sind monoziliäre Zellen mit einem kurzen bzw. elongierten Monozilium sowie unreife und reife multiziliäre Zellen. Seit Jahrzehnten wird der Fragestellung nachgegangen, ob sich aus einer monoziliären Zelle eine multiziliäre Zelle entwickelt, oder ob dies getrennte Entitäten sind, welche im Verlauf der Entwicklung auftreten. Ein Beispiel, wo dieser Aspekt nachgewiesen werden konnte, sind Ependymzellen im Ventrikelsystem (Delgehr et al. 2015). Ein oft in der Literatur verwendetes Modell aus dem Respirationstrakt stammt aus dem Jahr 2010 (Jain et al. 2010). Diese Arbeitsgruppe sieht Hinweise auf eine Transformation von nichtproliferativen monoziliären Zellen in differenzierte multiziliäre Zellen. Die Autoren empfehlen allerdings weiterführende Studien, um dieser Fragestellung nachzugehen.

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Dissertation beschriebenen Formen zilientragender Epithelzellen, welche während der Entwicklung des respiratorischen Epithels auftreten, mit der Literatur diskutiert. Übereinstimmend mit dem Modell von Jain et al. finden sich Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium (Abbildung 21, Abbildung 22) in den frühen Stadien der embryonalen Entwicklung (E12 bis E14,5). Dies stützt die These des Modells, dass es sich bei dieser Zellart um Progenitorzellen handelt. Diese existieren im nicht proliferierenden Zustand und können sich im Verlauf der Entwicklung in andere zilientragende Zellen differenzieren. Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium besitzen kurze Mikrovilli und eine nicht erhabene Zelloberfläche. Diese morphologischen Eigenschaften entsprechen denen nicht proliferierender Zellen. In späteren Stadien der Entwicklung sind sie nur noch rarefiziert im Zellverband nachweisbar. Ob es sich bei diesen kurzen Monozilien, wie durch Jain et al. beschrieben, um

Primärzilien handelt, lässt sich rückwirkend nicht eindeutig beantworten. Nach neusten Erkenntnissen kommt die klassische 9 + 0 Struktur der Mikrotubuli der Primärzilien nur an der Zilienbasis vor und ist weiter apikal nicht mehr vorhanden. Dort findet sich vielmehr ein unstrukturiertes Bündel von Mikrotubuli und Aktinfilamenten (Sun et al. 2019; Kiesel et al. 2020). Nachfolgende Studien können, mittels der Transmissionselektronenmikroskopie im Bereich des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle, diese Fragestellung bearbeiten. Eine Unterscheidung zwischen motilen Zilien und Primärzilien ist entscheidend, um die genaue Funktion dieser Zellart im Rahmen der Entwicklung des respiratorischen Epithels zu bestimmen. Primärzilien finden sich auf sehr vielen Zelltypen von Säugetieren und besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen (Liu et al. 2019; Li et al. 2021). Neben der Chemotransduktion, spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Proliferation und Homöostase von Stammzellen in einer Vielzahl von Geweben (Yanardag und Pugacheva 2021). Nach neusten Erkenntnissen spielen Primärzilien auf Progenitorzellen des adulten respiratorischen Epithels eine entscheidende Rolle für die Zelldifferenzierung dieser Zellart in eine multiziliäre Zelle (Belgacemi et al. 2021). Die Autoren dieser Arbeit erforschten an Zellkulturen den Einfluss der Zerstörung der Primärzilien auf die Anzahl der sich entwickelnden multiziliären Zellen und stellten fest, dass diese signifikant verringert waren. Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Rolle von Primärzilien während der Entwicklung des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle, kann durch weitere Arbeiten in diesem Bereich untersucht werden. Eine weitere Form von zilientragenden Epithelzellen, welche in dieser Dissertation beschrieben wurde, sind Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium (Abbildung 23). Sie besitzen ein Monozilium der Länge von bis zu 6 µm, einen dichten Besatz mit langen Mikrovilli und einen erhabenen Randwall der Zelloberfläche. Die Unterscheidung zwischen Epithelzellen mit einem kurzen (unter 2 µm) und einem langem (bis 6 µm) Monozilium im embryonalen respiratorischen Epithel ist in der Literatur, außerhalb der Arbeitsgruppe des EMZ Rostock (Reinke 2022), bisher nicht getroffen worden. Die Rolle dieser speziellen zilientragenden Zellart ist weiterhin noch unklar. In den späten Stadien der Entwicklung (E18) ist diese Zellart im respiratorischen Epithel der Nasenhöhle mit der Methode REM nicht mehr nachweisbar. Eine temporäre Rolle während der Entwicklung des respiratorischen Epithels kann für diese Zellart angenommen werden. Um diese Fragestellung allerdings vollständig zu klären, sind für die Methode der Immunofärbung spezifische Primärantikörper gegen Markerproteine von Monozilien notwendig, welche ausschließlich Monozilien (Primärzilien), aber keine multiziliären Zellen anfärben. Diese existieren zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht. Neuste Erkenntnisse im Bereich des adulten respiratorischen Epithels zeigen sogar die Existenz von „Hybrid Zilien“ auf, welche sowohl Eigenschaften von Primärzilien als auch von motilen Zilien besitzen (Liu et al. 2020). Laut dieser Arbeitsgruppe entsteht das Zilium aus dem Mutterzentriol, welches auch für die Bildung des Primärziliums verantwortlich war. Mit Hilfe von TEM Untersuchungen im Bereich

des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle kann zukünftig der Fragestellung nachgegangen werden, ob Hybrid Zilien auch während der Entwicklung vorhanden sind. Ebenfalls kann erforscht werden, ob es sich bei den nachgewiesenen elongierten Monozilien um motile Zilien, Primärzilien oder Hybrid Zilien handelt. Als dritte zilientragende Zellart, während der Entwicklung des respiratorischen Epithels, wurden in dieser Dissertation unreife multiziliäre Zellen (Abbildung 24) definiert. Sie sind durch multiple unterschiedlich lange Zilien an der Oberfläche gekennzeichnet, wobei viele Zilien eine Länge unter 5 bis 6 μm besitzen. Die Nomenklatur „unreif“ bezieht sich in diesem Fall auf die noch nicht voll ausgeprägte Zilienlänge von circa 6 μm und, dass sich weiter neue Zilien an der Epitheloberfläche ausbilden. Der Prozess der Reifung multiziliärer Zellen ist an vielen Epithelarten, unter anderem Ependymzellen im Ventrikelsystem, Eileiter/Samenstrang Epithel und im respiratorischen Epithel beschrieben worden (Spassky und Meunier 2017). Unreife multiziliäre Zellen lassen sich am selben Modellorganismus auch im Bereich der Trachea während der embryonalen Entwicklung nachweisen (Reinke 2022). Die in dieser Dissertation letzte definierte Form zilientragender Epithelzellen sind die reifen multiziliären Zellen (Abbildung 25). Als reife multiziliäre Zelle wird eine embryonale Flimmerepithelzelle bezeichnet, welche auf ihrer Oberfläche ausgewachsene Zilien mit einer Länge von circa 5 bis 6 μm besitzt. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus dem adulten menschlichen respiratorischen Epithel, in welchem reife multiziliäre Zellen Zilien besitzen, welche durch eine durchschnittliche Länge von 6 bis 7 μm und einem Durchmesser von 0,2 bis 0,3 μm gekennzeichnet sind (Tilley et al. 2015).

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Epithelentwicklung in den Stadien E12 bis E18 auf den Lokalisationen der Concha nasalis media und dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen diskutiert. In dieser Dissertation wurden erstmals zwei Lokalisationen in der Nasenhöhle bezüglich der Epithelreifung des respiratorischen Epithels miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass ein geschlossener Zellverband mit multiziliären Zellen auf den beiden genannten Lokalisationen zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt auftritt. Auf dem Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum ist die Epithelreifung in Bezug auf den Besatz mit multiziliären Zellen zwei Tage früher als auf der Concha nasalis media abgeschlossen. Frühere elektronenmikroskopische Arbeiten untersuchten das embryonale respiratorische Epithel an unterschiedlichen Lokalisationen im Respirationstrakt und verwendeten dabei verschiedenen Modellorganismen. Für die Lokalisation der Concha nasalis media existiert eine elektronenmikroskopische Referenzarbeit am Modellorganismus des Huhns (Fauziah et al. 2003). Das Nasenseptum wurde am Organismus der Ratte in den Stadien E14 bis E22 mit den Methoden der REM und der TEM untersucht (Menco und Farbman 1987). Für die Lokalisation der Trachea existiert am Modellorganismus des Haushuhns (var. White leghorn) eine institutsinterne Referenzarbeit in den Stadien E14 bis E18 mit den Methoden der REM und TEM (Reinke 2022).

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Dissertation mit der institutsinternen Referenzarbeit im Bereich der Trachea diskutiert (Reinke 2022). Die Ergebnisse sind mit dieser Dissertation vergleichbar, weil derselbe Modellorganismus des Haushuhns (var. White Leghorn) in ähnlichen embryonalen Entwicklungsstadien (E14 bis E18) verwendet wurde. Es kam die gleiche Methode zur Validierung des embryonalen Alters zur Anwendung (Hamburger und Hamilton 1992). Die genaue Altersbestimmung der Embryonen ist von entscheidender Bedeutung, da es innerhalb von 12 bis 24 Stunden zu signifikanten Veränderungen in der Reifung des respiratorischen Epithels kommt. Die Aufarbeitung der Proben für die REM Untersuchung, erfolgte anhand derselben institutsinternen Protokolle (Protokoll 1 bis 5). Die REM Bilder wurden am selben Gerät (Zeiss Merlin VP compact) aufgenommen. Die in dieser Dissertation eingeführte Nomenklatur zur Beschreibung der monoziliären und multiziliären Zellen des Epithelverbandes wird im Folgenden auch auf die Ergebnisse der institutsinternen Referenzarbeit angewandt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Es zeigte sich dabei, dass die beschriebenen vier Formen zilientragender Epithelzellen auch in der Trachea während der Entwicklung nachweisbar waren. Ebenfalls ist die chronologische Abfolge des Auftretens der einzelnen Arten zilientragender Epithelzellen in der Trachea identisch mit den untersuchten Lokalisationen der Nasenhöhle. So zeigte sich in allen Lokalisationen am Beginn des Untersuchungszeitraumes ein Epithel, in welchem Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium nachweisbar waren. Im Verlauf treten Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, unreife sowie reife multiziliäre Zellen auf. Die Tabelle 7 ist eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse des Nachweises der definierten Arten zilientragender Epithelzellen an den drei untersuchten Lokalisationen. An allen untersuchten Bereichen im zilientragenden Respirationstrakt finden sich im Stadium E12 Epithelzellen im Zellverband, welche auf ihrer Oberfläche ein kurzes Monozilium besitzen. Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, könnte es sich bei dieser Zellart um Progenitorzellen handeln, welche auch in früheren Stadien der Entwicklung nachweisbar sind. Auf dem Nasenseptum finden sich elongierte monoziliäre Zellen bereits 1 bis 1,5 Tage früher im Zellverband als in der Trachea und auf der Concha nasalis media. Die genannten Entwicklungsstadien stellen nur den Beginn des Nachweises elongierter monoziliärer Zellen dar. Sie sind an allen untersuchten Lokalisationen auch in späteren Entwicklungsstadien nachweisbar, in welchem sie parallel mit unreifen und reifen multiziliären Zellen existieren.

Diskussion

	Trachea	Concha nasalis media	Nasenhöhlendach und Nasenseptum
Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium	E12	E12	E12
Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium	E14	E14,5	E13
Unreife multiziliäre Zellen	E14,5	E14,5	E13
flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen	E18	E18	E16

Tabelle 7: Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Dissertation mit den Ergebnissen einer früheren Arbeit von (Reinke 2022) im Bereich der Trachea. Es erfolgte eine Übertragung der Ergebnisse aus der Trachea auf die in dieser Dissertation eingeführten neuen Nomenklatur. Somit ist ein Vergleich der Entwicklung des respiratorischen Epithels der drei Lokalisationen Concha nasalis media, Trachea und Nasenhöhlendach/Nasenseptum in Hinblick auf die Ausprägung der unterschiedlichen Arten zilientrager Epithelzellen möglich. Quelle: eigene Ergebnisse und (Reinke 2022)

Dieser Trend zeigt sich auch im Hinblick auf das erste Auftreten unreifer multiziliärer Zellen im Zellverband. Unreife multiziliäre Zellen sind auf dem Nasenhöhlendach/Nasenseptum ebenfalls 1,5 Tage früher im Zellverband nachweisbar als auf der Concha nasalis media und der Trachea. Abschließend findet sich auch ein flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen ebenfalls 2 Tage früher auf dem Nasenhöhlendach/Nasenseptum als auf der Concha nasalis media und der Trachea. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das respiratorische Epithel der Concha nasalis media und der Trachea zeitlich parallel entwickeln. Im Unterschied dazu existieren in der Trachea allerdings höhere lokale Divergenzen, in Hinblick auf den Besatz mit Zilien in frühen Entwicklungsstadien im zeitlichen Verlauf. Diese lokalen Unterschiede finden sich auf der Concha nasalis media nicht in diesem Umfang. Im Gegensatz zu diesen beiden Lokalisationen entwickelt sich das respiratorische Epithel des Nasenhöhlendachs mit dem angrenzenden Nasenseptum zeitlich versetzt. Wie bereits aus früheren Arbeiten bekannt, ist die Aktivierung des *FOXJ1* Gens notwendig, um multiple motile Zilien an der Zelloberfläche auszubilden (Jain et al. 2010). Zukünftige Arbeiten im Bereich der Nasenhöhle können untersuchen, ob es zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt zur Aktivierung

des FOXJ1 Gens an den Lokalisationen des Nasenhöhlendachs/Nasenseptums und der Concha nasalis media kommt.

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Dissertation mit früheren Arbeiten der Methode der REM diskutiert. Am Organismus des Haushuhns wurde an den Lokalisationen der Concha nasalis media und der Trachea ab einem Entwicklungsstadium von E15 mit der Methode REM die Ziliogenese des respiratorischen Epithels untersucht (Fauziah et al. 2003). Eine Vergleichbarkeit dieser Dissertation mit den Ergebnissen von Fauziah et al. ist jedoch eingeschränkt, da diese Arbeit viele methodische Mängel aufweist. Diese sind unter anderem: die fehlende Angabe der Hühnerrasse, das Verwenden einer Zuchthenne anstatt eines Brutapparates mit konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit, keine Validierung des Alters der Hühnerembryonen nach der bekannten Methode von Hamburger und Hamilton sowie die mindere Qualität der REM Aufnahmen, welche keine umfassende Analyse der feinsten ziliären Strukturen erlauben. Diese Aspekte führen dazu, dass die zeitlichen Angaben bei Fauziah et al. nicht validiert sind und damit ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen nur eingeschränkt möglich ist. Trotz dieser Limitationen besteht eine Gemeinsamkeit der Ergebnisse in Bezug auf der zeitlich parallelen Entwicklung des respiratorischen Epithels zwischen der Concha nasalis media und der Trachea. Eine weitere Arbeit untersuchte das respiratorische Epithel im Bereich des Nasenseptums am Organismus der Ratte in den embryonalen Entwicklungstagen E13 bis E22, mit den Methoden der REM und der TEM (Menco und Farbman 1987). In dem Modellorganismus der Ratte wurde nachgewiesen, dass am Tag E13 und E14 die meisten Epithelzellen des Nasenseptums ein Monozilium und multiple Mikrovilli besitzen. Im Stadium E18 wurden erste unreife multiziliäre Zellen gefunden. Am Tag E21 ist ein flächendeckender Besatz mit reifen multiziliären Zellen nachweisbar. Vergleichend mit den Ergebnissen aus dieser Dissertation lässt sich feststellen, dass zwischen den zwei Spezies Vogel (Haushuhn) und Säugetier (Ratte) die Zeitspanne zwischen dem ersten Auftreten unreifer multiziliärer Zellen und einem flächendeckenden Besatz mit reifen multiziliären Zellen circa 2 bis 4 Tage beträgt.

Die Immunofärbung findet seit vielen Jahren Anwendung im Bereich der Pathologie und der Anatomie (Pellicciari 2018). So gibt es Untersuchungen von Zilien im Bereich der Cochlea mit dem Primärantikörper anti-ac-Tub-Ak (Liu et al. 2018), allerdings wenig Daten zur Beschreibung von Zilien des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Dissertation zeigen erstmals die embryonale Entwicklung von Flimmerepithelzellen des Haushuhns im Bereich der Nasenhöhle an zwei unterschiedlichen Lokalisationen mit der Methode der Immunofärbung. Die Anwendung dieser Methode erfolgte in dieser Dissertation zur Validierung der im REM gefundenen Ergebnisse, der genauen anatomischen Zuordnung der Zielbereiche im Gewebeverband, sowie der Analyse der Strukturen in enger anatomischer Beziehung zum respiratorischen Epithel.

Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Immunofärbung in den Stadien E12 bis E17,5 an den zwei untersuchten Lokalisationen mit denen im REM gefundenen Ergebnissen verglichen, sowie mit der bekannten Literatur diskutiert. Für die Lokalisation der Concha nasalis media wurden in den Stadien E12 bis E14,5 mit der Immunofärbung keine Braunfärbungen, im Stadium E15 vereinzelt Braunfärbungen, ab dem Stadium E16 eine Clusterbildung von Braunfärbungen und im Stadium E17,5 Epithelfurchen mit einem geschlossenen Verband von Braunfärbungen, nachgewiesen. Daraus folgt, dass mit der Methode der Immunofärbung das erste Auftreten von monoziliären Zellen sowie unreifer multiziliärer Zellen nur schwer beurteilbar ist. Im Gegensatz dazu konnten diese Formen zilienträger Epithelzellen mit der REM Untersuchung sicher auch bereits in den frühen Stadien der embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden. Mit der Methode der Immunofärbung gelang der Nachweis erster Cluster aus multiziliären Zellen. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass erste multiziliäre Zellen im Stadium E14,5 auf der Concha nasalis media nur unregelmäßig und sehr rarefiziert auf der Oberfläche nachweisbar sind. Um diese mit der Methode der Immunofärbung detektieren zu können, müssten mehr Schnittebenen untersucht werden, um diese rarefizierten Zellen zu entdecken. Die rostrokaudale Ausdehnung der Nasenhöhle im Alter E12 beträgt beispielsweise 0,4 cm, dies entspricht 4000 μm . Da ein Schnitt 10 μm dick ist, bedeutet dies eine Schnittanzahl von 400 Schnitten pro Kopf, um die gesamte rostrokaudale Ausdehnung abzubilden. Mit dem steigenden embryonalen Alter nimmt die rostrokaudale Ausdehnung zu und es erhöht sich die Schnittanzahl in diesen Stadien weiter. Für die Fragestellung des ersten Auftretens von monoziliären Zellen und unreifen multiziliären Zellen hat die REM Untersuchung dort ihren Vorteil. Weiterhin ist mit der Immunofärbung eine Unterscheidung zwischen unreifen und reifen multiziliären Zellen im Gegensatz zur REM Methode, nicht sicher möglich. Dieser Sachverhalt trifft in gleicher Form auch für die zweite untersuchte Lokalisation des Nasenhöhlendachs mit dem angrenzenden Nasenseptum zu.

In der bereits erwähnten Arbeit von Reinke 2022, kam die Immunofluoreszenzfärbung mit demselben Primärantikörper gegen acetyliertes-alpha-Tubulin zur Anwendung (Reinke 2022). Dabei zeigte sich im Bereich der Trachea, dass im Stadium E14 keine Epithelzellen mit Monozilien sicher nachweisbar waren. Dies stimmt auch mit der Methode der Immunofärbung in dieser Dissertation gefundenen Ergebnisse im Bereich beider Lokalisationen in der Nasenhöhle überein. Zusammenfassend ließen sich an allen untersuchten Lokalisationen mit demselben Primärantikörper gegen acetyliertes-alpha-Tubulin, Monozilien an der Oberfläche nicht sicher identifizieren. Für den Bereich der Nasenhöhle ist eine Unterscheidung zwischen Artefakten und kleinsten Braunfärbungen, welche an der Oberfläche auf die Existenz von Monozilien hindeuten können, methodenbedingt nur schwer möglich. Dies gilt für alle untersuchten Verdünnungsstufen des verwendeten Primärantikörpers. Wie in den oberen Absätzen bereits

erläutert ist die Binnenstruktur der Monozilien weiterhin unklar. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen stand für die spezifische Anfärbung von Monozilien kein geeigneter Marker zur Verfügung. In der Trachea konnte im Stadium E16 eine deutliche Zunahme von multiziliären Zellclustern verzeichnet werden. Dies stimmt mit den auf der Concha nasalis media mit der Immunofärbung gefundenen Ergebnissen überein. Am Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum stellt sich im Stadium E16 allerdings ein flächendeckender Besatz mit multiziliären Zellen dar. An den anderen untersuchten Lokalisationen der Trachea und der Concha nasalis media, ist dieser Sachverhalt erst im Stadium E18 nachweisbar. Dies bestätigt die im REM beschriebenen Ergebnisse. Zusammenfassend gelingt, sowohl mit der Methode der Immunofärbung und der Immunofluoreszenz, in der Trachea, als auch in der Nasenhöhle, sicher der Nachweis von Clustern multiziliärer Zellen. Eine Unterscheidung zwischen unreifen und reifen multiziliären Zellen kann allerdings nur mit der REM Untersuchung sicher getroffen werden.

Im folgenden Absatz werden die Ergebnisse aus dem Kapitel „Besonderheiten der Epithelfurchen“ diskutiert. In dieser Dissertation wurde der Fragestellung nachgegangen, ob auch im Bereich der Nasenhöhle am Grund der Epithelfurchen, Epithelzellen existieren, welche an ihrer Oberfläche keine Zilien ausbilden. Dieser Sachverhalt wurde erstmals in der institutsinternen Referenzarbeit im Bereich der Trachea beschrieben (Reinke 2022). Zur Epithelreifung des respiratorischen Epithels gehört neben der Ausbildung multipler Zilien auf der Oberfläche der Epithelzellen auch eine Einfaltung des respiratorischen Epithels. In der Literatur werden schematische Abbildungen des reifen respiratorischen Epithels häufig gänzlich ohne die Epithelfurchen dargestellt. In dieser Dissertation konnten die in der Trachea beschriebene besondere Anatomie, mit Fehlen von Zilien auf Epithelzellen am Grund der Epithelfurchen, für die Lokalisation der Nasenhöhle bestätigt werden. Zur Untersuchung dieses Phänomens, eignete sich besonders die Immunofärbung, weil der Grund der Epithelfurchen im Schnittbild voll einsehbar ist und diese Methode besonders spezifisch multiziliäre Zellen anfärben kann. Mit der Immunofärbung konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen um hochprismatische Zellen ohne Zilien mit einem basal gelegenen Nucleus handelt. Mit der REM Untersuchung gelingt der Nachweis der Ausbildung von Epithelfurchen. Allerdings ist nur an den Bruchkanten eine Tiefenausdehnung und Beschreibung der Zellen in den Tiefen der Furchen möglich. Die Funktion dieser zilienlosen Epithelzellen im Organismus des Haushuhns ist weiterhin unklar, allerdings existieren Untersuchungen am Menschen und am Schwein zur Physiologie der Epithelfurchen. Dabei zeigte sich am Epithelgrund der Bronchiolen, dass Zellen vorkommen, welche in Analogie zum Kolon, sekretorische Aufgaben erfüllen (Quinton 2017). So wurden dort unter anderem am Furchengrund vermehrt Goblet Zellen entdeckt. Außerdem wurden am Grund der Epithelfurchen Zellen nachgewiesen, welche den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter NKCC1

(Flores-Delgado et al. 2016) und den $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter NBC1 (Shamsuddin und Quinton 2014, 2019) exprimieren. Dieses Modell geht davon aus, dass am Furchengrund eine Sekretion von Flüssigkeit erfolgt, während an der Epitheloberfläche die Resorption stattfindet. Um welche Zellart es sich bei den gefundenen zilienlosen Zellen genau handelt, bleibt weiterhin unklar. Es ist denkbar, dass es sich in Analogie zu den gefundenen Ergebnissen im Menschen und Schwein, in der Nasenhöhle ebenfalls um Zellen handelt, welche sekretorische Aufgaben erfüllen. Die Vergleichbarkeit ist aber eingeschränkt, da es sich in diesen Arbeiten um Epithelfurchen von einem reifen respiratorischen Epithel der Bronchiolen handelt und nicht wie in dieser Dissertation, um das embryonale respiratorische Epithel der Nasenhöhle. Weitere Untersuchungen dieser speziellen Zellart sind nötig, um die Funktionen eindeutig zu klären.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Der Schwerpunkt dieser Dissertation war die Untersuchung der embryonalen Entwicklung des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle an den zwei untersuchten Lokalisationen der Concha nasalis media und dem Nasenhöhlendach/Nasenseptum, am Modellorganismus des Haushuhns, im Hinblick auf die Ausprägung von zilientragenden Zellen im Zellverband. Es wurden Untersuchungen in den embryonalen Stadien E12 bis E18 mit der Rasterelektronenmikroskopie und der Immunofärbung durchgeführt. Der Fokus lag nicht auf der Untersuchung von spezifischen intrazellulären oder extrazellulären Signalwegen. Aufgrund der zunehmenden Inzidenz von Erkrankungen des respiratorischen Epithels, durch exogen toxische Noxen, Infektionen und hereditäre Erkrankungen, ist die Forschung über die Entwicklung und Regeneration dieser Epithelart von entscheidender klinischer Bedeutung. Die in dieser Dissertation gefundenen Erkenntnisse können dazu beitragen, Regenerationsprozesse nach Infektionen und Schädigungen besser zu verstehen (Basil et al. 2020), sowie Forschungen im Bereich der Therapie von Erkrankungen des zilientragenden Gewebes, wie bei der PCD (Paff et al. 2021) zu ermöglichen. Das Haushuhn hat sich zusammenfassend als ein gut geeigneter Modellorganismus zur embryonalen Forschung im Bereich der Nasenhöhle herausgestellt. Um die offenen Fragen in Bezug auf die Entwicklung monoziliärer Zellen zu klären, können serielle Untersuchungen am selben Modellorganismus mit der Methode der Transmissionselektronenmikroskopie empfohlen werden. Zukünftige Studien in diesem Bereich können mittels derselben Methoden der REM und der Immunofärbung den Einfluss von viralen und bakteriellen Infektionen, der Schädigung nach Inhalation toxischer Partikel, sowie den Einfluss hereditärer Erkrankungen auf das Zilienwachstum untersuchen. Dies stellt die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieverfahren dar.

6. Thesen zur Dissertation

1. Das Haushuhn ist aufgrund seiner durchschnittlichen Inkubationszeit von nur 21 Tagen und der Möglichkeit der exakten stundengenauen Entnahme der Hühnerembryonen aus dem Brutapparat ein gut bewährter Modellorganismus für die embryonale Forschung.
2. Erstmals gelang in einem ausgedehnten embryonalen Entwicklungszeitraum von E12 bis E18 die systematische Analyse der Nasenhöhle des Haushuhns anhand von Koronarschnitten. Dieser umfangreiche embryonale Untersuchungszeitraum von 7 Tagen, unter Einbeziehung von halben Entwicklungstagen (z.B. E14,5), ermöglichte zum ersten Mal eine umfassende Abbildung der Entwicklung des embryonalen respiratorischen Epithels der Nasenhöhle in Hinblick auf ihren Zilienbesatz.
3. Neu war der Ansatz, zwei unterschiedliche Lokalisationen in der Nasenhöhle in Bezug auf die Ausprägung von Zilien des embryonalen respiratorischen Epithels, zu vergleichen. So wurde erstmals die Concha nasalis media und das Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum parallel untersucht.
4. Die Rasterelektronenmikroskopie und die Immunfärbung mit einem Zilienmarker (Antikörper gegen acetyliertes alpha Tubulin) sind effektive Verfahren, um Zilien auf dem embryonalen respiratorischen Epithel der Nasenhöhle sicher nachzuweisen. Eine Konzentration von 1:10.000 des Primärantikörpers gegen acetyliertes alpha Tubulin hat sich als besonders geeignet erwiesen.
5. Die Anatomie der Nasenhöhle des embryonalen Haushuhns ist komplex. Koronarschnitte durch die Nasenhöhle haben sich besonders bewährt, um während der embryonalen Entwicklung die zwei untersuchten Regionen der Nasenhöhle in den verschiedenen embryonalen Stadien sicher identifizieren zu können.
6. Entwickelt wurde eine Präparationsmethode zur Erzeugung von reproduzierbaren Koronarschnitten durch die Nasenhöhle des embryonalen Haushuhns für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.
7. Es erfolgte die Erstellung einer neuen Klassifikation der zilientragenden Epithelzellen während der embryonalen Entwicklung. Diese ermöglicht eine standardisierte Beschreibung und Analyse der Epitheloberfläche des respiratorischen Epithels während der Entwicklung mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie.

8. Es konnte zum ersten Mal beobachtet werden, dass an den beiden untersuchten Lokalisationen in der Nasenhöhle, Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium, Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium, unreife multiziliäre Zellen sowie reife multiziliäre Zellen in charakteristischer Abfolge im Zellverband auftreten.
9. Erstmals gelang der Nachweis, dass sich das respiratorische Epithel auf der Concha nasalis media im Vergleich zum Nasenhöhlendach mit dem angrenzenden Nasenseptum zeitlich versetzt entwickelt.
10. So konnten bereits im Stadium E12 Epithelzellen mit einem kurzen Monozilium an beiden Lokalisationen in der Nasenhöhle im Zellverband nachgewiesen werden.
11. Die unterschiedliche Entwicklung der beiden Untersuchungslokalisationen konnte in Bezug auf die Ausprägung von Epithelzellen mit einem elongierten Monozilium beobachtet werden. Auf dem Nasenhöhlendach/Nasenseptum finden sich diese Zellen bereits ab dem Stadium E13 im Zellverband. Auf der Concha nasalis media wurden diese im Gegensatz dazu erst ab dem Stadium E14,5 nachgewiesen.
12. Auf der Concha nasalis media treten erste unreife multiziliäre Zellen im Stadium E14,5 auf. Im Bereich des Nasenhöhlendachs mit dem angrenzenden Nasenseptum kommen erste unreife multiziliäre Zellen bereits im Stadium E14 vor.
13. Erstmals konnte gezeigt werden, dass ein geschlossener Zellverband multiziliärer Zellen auf dem Nasenhöhlendach/Nasenseptum 2 Tage früher, im Stadium E16, als auf der Concha nasalis media, im Stadium E18, zu beobachten ist.
14. Am Grund der tiefen Epithelfurchen des respiratorischen Epithels der Nasenhöhle existieren Epithelzellen ohne den Besatz mit Zilien. Somit konnten die Ergebnisse aus einer früheren institutsinternen Arbeit im Bereich der Trachea (Reinke 2022), am selben Modellorganismus, bestätigt werden.

7. Literaturverzeichnis

- (Ahrens 2012): Ahrens, P.: Die primäre ziliäre Dyskinesie. In: *Pneumologie* 9 (3), S. 217–230.
- (Avasthi und Marshall 2012): Avasthi, Prachee; Marshall, Wallace F.: Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. In: *Differentiation; research in biological diversity* 83 (2), S30-42.
- (Azimzadeh et al. 2012): Azimzadeh, Juliette; Wong, Mei Lie; Downhour, Diane Miller; Sánchez Alvarado, Alejandro; Marshall, Wallace F.: Centrosome loss in the evolution of planarians. In: *Science (New York, N.y.)* 335 (6067), S. 461–463.
- (Barbato et al. 2009): Barbato, A.; Frischer, T.; Kuehni, C. E.; Snijders, D.; Azevedo, I.; Baktai, G. et al.: Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. In: *The European respiratory journal* 34 (6), S. 1264–1276.
- (Basil et al. 2020): Basil, Maria C.; Katzen, Jeremy; Engler, Anna E.; Guo, Minzhe; Herriges, Michael J.; Kathiriya, Jaymin J. et al.: The Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. In: *Cell Stem Cell* 26 (4), S. 482–502.
- (Belgacemi et al. 2021): Belgacemi, Randa; Diabasana, Zania; Hoarau, Antony; Dubernard, Xavier; Mérol, Jean-Claude; Ruaux, Christophe et al.: Primary ciliogenesis is a crucial step for multiciliated cell determinism in the respiratory epithelium. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 25 (15), S. 7575–7579.
- (Beydon et al. 2022): Beydon, Nicole; Ferkol, Thomas; Harris, Amanda Lea; Colas, Murielle; Davis, Stephanie D.; Haarman, Eric et al.: An international survey on nasal nitric oxide measurement practices for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. In: *ERJ Open Research* 8 (2).
- (Bjørnstad et al. 2015): Bjørnstad, Sigrid; Austdal, Lars Peter Engeset; Roald, Borghild; Glover, Joel Clinton; Paulsen, Ragnhild Elisabeth: 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.
- (Boon et al. 2014): Boon, Mieke; Wallmeier, Julia; Ma, Lina; Loges, Niki Tomas; Jaspers, Martine; Olbrich, Heike et al.: MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. In: *Nat Commun* 5, S. 4418.
- (Breslow und Holland 2019): Breslow, David K.; Holland, Andrew J.: Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis. In: *Annual review of biochemistry* 88, S. 691–724.
- (Brooks und Wallingford 2014): Brooks, Eric R.; Wallingford, John B.: Multiciliated cells. In: *Current biology : CB* 24 (19), R973-82.

- (Casteleyn et al. 2018): Casteleyn, C.; Cornillie, P.; van Cruchten, S.; van den Broeck, W.; van Ginneken, C.; Simoens, P.: Anatomy of the upper respiratory tract in domestic birds, with emphasis on vocalization. In: *Anatomia, Histologia, Embryologia* 47 (2), S. 100–109.
- (Chen et al. 2014): Chen, Gang; Korfhagen, Thomas R.; Karp, Christopher L.; Impey, Soren; Xu, Yan; Randell, Scott H. et al.: Foxa3 induces goblet cell metaplasia and inhibits innate antiviral immunity. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 189 (3), S. 301–313.
- (Ciancio et al. 2015): Ciancio, Nicola; Santi, Maria Margherita de; Campisi, Raffaele; Amato, Laura; Di Martino, Giuseppina; Di Maria, Giuseppe: Kartagener's syndrome: review of a case series. In: *Multidisciplinary respiratory medicine* 10 (1), S. 18.
- (Collins et al. 2014): Collins, Samuel A.; Gove, Kerry; Walker, Woolf; Lucas, Jane S. A.: Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. In: *European Respiratory Journal* 44 (6), S. 1589–1599.
- (Damseh et al. 2017): Damseh, Nadirah; Quercia, Nada; Rumman, Nisreen; Dell, Sharon D.; Kim, Raymond H.: Primary ciliary dyskinesia: mechanisms and management. In: *The Application of Clinical Genetics* 10, S. 67–74.
- (Dan et al. 2018): Dan, Wei; Gao, Nannan; Li, Lei; Zhu, Jing-Xiang; Diao, Lei; Huang, Jiansong et al.: α -Tubulin Acetylation Restricts Axon Overbranching by Dampening Microtubule Plus-End Dynamics in Neurons. In: *Cereb Cortex* 28 (9), S. 3332–3346.
- (Delgehyr et al. 2015): Delgehyr, Nathalie; Meunier, Alice; Faucourt, Marion; Bosch Grau, Montserrat; Strehl, Laetitia; Janke, Carsten; Spassky, Nathalie: Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. In: *Methods in cell biology* 127, S. 19–35.
- (Emmer et al. 2010): Emmer, Brian T.; Maric, Danijela; Engman, David M.: Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 4), S. 529–536.
- (Eshun-Wilson et al. 2019): Eshun-Wilson, Lisa; Zhang, Rui; Portran, Didier; Nachury, Maxence V.; Toso, Daniel B.; Löhr, Thomas et al.: Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. In: *PNAS* 116 (21), S. 10366–10371.
- (EU Bericht 2018): EU Bericht: Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018, S. 3.
- (Fauziah et al. 2003): Fauziah, O.; Purton M. D.; Solomon S. E.: Surface Morphology of the developing respiratory epithelium of chicks. In: *Journal Veterinar Malaysia* (15 (1&2)), S. 21–25.

- (Firth et al. 2014): Firth, Amy L.; Dargitz, Carl T.; Qualls, Susan J.; Menon, Tushar; Wright, Rebecca; Singer, Oded et al.: Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. In: *PNAS* 111 (17), E1723-30.
- (Fisch und Dupuis-Williams 2011): Fisch, Cathy; Dupuis-Williams, Pascale: Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! In: *Biology of the cell* 103 (6), S. 249–270.
- (Fischer et al. 2012): Fischer, Bernd; Chavatte-Palmer, Pascale; Viebahn, Christoph; Navarrete Santos, Anne; Duranthon, Veronique: Rabbit as a reproductive model for human health. In: *Reproduction* 144 (1), S. 1–10.
- (Flores-Delgado et al. 2016): Flores-Delgado, Guillermo; Lytle, Christian; Quinton, Paul M.: Site of Fluid Secretion in Small Airways. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 54 (3), S. 312–318.
- (Forsyth und Gunay-Aygun 2020): Forsyth, Raelynn; Gunay-Aygun, Meral: Bardet-Biedl Syndrome Overview: GeneReviews Database.
- (Forsythe et al. 2018): Forsythe, Elizabeth; Kenny, Joanna; Bacchelli, Chiara; Beales, Philip L.: Managing Bardet-Biedl Syndrome-Now and in the Future. In: *Front. Pediatr.* 6, S. 23.
- (Gagnieur et al. 2014): Gagnieur, Léa; Cheval, Justine; Cochet, Marielle; Breard, Emmanuel; Gratigny, Marlène; Hébert, Charles et al.: Analysis by high throughput sequencing of Specific Pathogen Free eggs. In: *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 42 (4), S. 218–219.
- (Garcia et al. 2018): Garcia, Galo; Raleigh, David R.; Reiter, Jeremy F.: How the Ciliary Membrane Is Organized Inside-Out to Communicate Outside-In. In: *Current biology : CB* 28 (8), R421-R434.
- (Gerth-Kahlert und Koller 2018): Gerth-Kahlert, Christina; Koller, Samuel: Retinale Ziliopathien. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 235 (3), S. 264–272.
- (Gomez und Celii 2008): Gomez, George; Celii, Amanda: The peripheral olfactory system of the domestic chicken: physiology and development. In: *Brain research bulletin* 76 (3), S. 208–216.
- (Gonçalves und Pelletier 2017): Gonçalves, João; Pelletier, Laurence: The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. In: *Molecules and cells* 40 (4), S. 243–253.
- (Greenan et al. 2020): Greenan, Garrett A.; Vale, Ronald D.; Agard, David A.: Electron cryotomography of intact motile cilia defines the basal body to axoneme transition. In: *J Cell Biol* 219 (1).

- (Greulich 2019): Greulich, Martha Anett: Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen der Lungenentwicklung mit epithelialen und mesenchymalen Markern im embryonalen Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*). Dissertation. Universität Rostock. Elektronenmikroskopisches Zentrum Rostock.
- (Hamburger und Hamilton 1992): Hamburger, V.; Hamilton, H. L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. Reprinted from *Journal of Morphology* Vol. 88, 1951. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 195 (4), S. 231–272.
- (Hempel 2017): Hempel, E.: Immunzytochemische Untersuchung der anterioren Luftsackentwicklung mit epithelialen und mesenchymalen Markern im embryonalen Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*). Dissertation. Universität Rostock. Elektronenmikroskopisches Zentrum Rostock.
- (Hildebrandt et al. 2011): Hildebrandt, Friedhelm; Benzing, Thomas; Katsanis, Nicholas: Ciliopathies. In: *The New England journal of medicine* 364 (16), S. 1533–1543.
- (Hogan et al. 2020): Hogan, Aneila V. C.; Watanabe, Akinobu; Balanoff, Amy M.; Bever, Gabriel S.: Comparative growth in the olfactory system of the developing chick with considerations for evolutionary studies. In: *Journal of Anatomy* 237 (2), S. 225–240.
- (Hogan und Tata 2019): Hogan, Brigid; Tata, Purushothama Rao: Cellular organization and biology of the respiratory system. In: *Nature cell biology*.
- (Horani et al. 2016): Horani, Amjad; Ferkol, Thomas W.; Dutcher, Susan K.; Brody, Steven L.: Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. In: *Paediatric respiratory reviews* 18, S. 18–24.
- (Horani und Ferkol 2016): Horani, Amjad; Ferkol, Thomas W.: Primary ciliary dyskinesia and associated sensory ciliopathies. In: *Expert review of respiratory medicine* 10 (5), S. 569–576.
- (Ishikawa 2017): Ishikawa, Takashi: Axoneme Structure from Motile Cilia. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (1).
- (Jain et al. 2010): Jain, Raksha; Pan, Jiehong; Driscoll, James A.; Wisner, Jeffrey W.; Huang, Tao; Gunsten, Sean P. et al.: 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.
- (Kanda und Hilding 1968): Kanda, T.; Hilding, D.: Development of respiratory tract cilia in fetal rabbits. Electron microscopic investigation. In: *Acta Oto-Laryngologica* 65 (6), S. 611–624.

- (Kiesel et al. 2020): Kiesel, Petra; Alvarez Viar, Gonzalo; Tsoy, Nikolai; Maraspini, Riccardo; Gorilak, Peter; Varga, Vladimir et al.: The molecular structure of mammalian primary cilia revealed by cryo-electron tomography. In: *Nature structural & molecular biology* 27 (12), S. 1115–1124.
- (Kim et al. 2016): Kim, So-Woon; Roh, Jin; Park, Chan-Sik: Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. In: *Journal of Pathology and Translational Medicine* 50 (6), S. 411–418.
- (Kim und Kim 2019): Kim, Yong Joon; Kim, Joon: Therapeutic perspectives for structural and functional abnormalities of cilia. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 76 (19), S. 3695–3709.
- (Kirbas Dogan und Takici 2018): Kirbas Dogan, Gülseren; Takici, Ismet: Anatomy of Respiratory System in Poultry. In: *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, S. 141–147.
- (Klink et al. 2020): Klink, Björn Udo; Gatsogiannis, Christos; Hofnagel, Oliver; Wittinghofer, Alfred; Raunser, Stefan: Structure of the human BBSome core complex. In: *eLife Sciences Publications, Ltd.*
- (König 2009): König, Horst Erich: Anatomie der Vögel. Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer (Anatomie der Vögel).
- (Krstic 1991): Krstic, R. V.: Human Microscopic Anatomy. An Atlas for Students of Medicine and Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- (Kulaga et al. 2004): Kulaga, Heather M.; Leitch, Carmen C.; Eichers, Erica R.; Badano, Jose L.; Lesemann, Alysa; Hoskins, Bethan E. et al.: Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. In: *Nat Genet* 36 (9), S. 994–998.
- (Kunimoto et al. 2012): Kunimoto, Koshi; Yamazaki, Yuji; Nishida, Tomoki; Shinohara, Kyosuke; Ishikawa, Hiroaki; Hasegawa, Toshiaki et al.: Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. In: *Cell* 148 (1-2), S. 189–200.
- (Lee et al. 2012): Lee, Robert J.; Xiong, Guoxiang; Kofonow, Jennifer M.; Chen, Bei; Lysenko, Anna; Jiang, Peihua et al.: T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (11), S. 4145–4159.
- (Leigh et al. 2019): Leigh, Margaret W.; Horani, Amjad; Kinghorn, BreAnna; O'Connor, Michael G.; Zariwala, Maimoona A.; Knowles, Michael R.: Primary Ciliary Dyskinesia (PCD): A genetic disorder of motile cilia. In: *Translational Science of Rare Diseases* 4 (1-2), S. 51–75.
- (Li et al. 2021): Li, Sijin; Zhang, Han; Sun, Yao: Primary cilia in hard tissue development and diseases. In: *Frontiers of medicine* 15 (5), S. 657–678.

- (Liu et al. 2018): Liu, Wenjing; Wang, Chuanxi; Yu, Hao; Liu, Shaofeng; Yang, Jun: Expression of acetylated tubulin in the postnatal developing mouse cochlea. In: *European Journal of Histochemistry : EJH* 62 (3).
- (Liu et al. 2019): Liu, Zhibin; Tu, Haiqing; Kang, Yunsi; Xue, Yuanyuan; Ma, Dongyuan; Zhao, Chengtian et al.: Primary cilia regulate hematopoietic stem and progenitor cell specification through Notch signaling in zebrafish. In: *Nat Commun* 10 (1), S. 1839.
- (Liu et al. 2020): Liu, Zhen; Nguyen, Quynh P. H.; Nanjundappa, Rashmi; Delgehyr, Nathalie; Megherbi, Alexandre; Doherty, Regan et al.: Super-Resolution Microscopy and FIB-SEM Imaging Reveal Parental Centriole-Derived, Hybrid Cilium in Mammalian Multiciliated Cells. In: *Developmental cell* 55 (2), 224-236.e6.
- (Loots und Nel 1989): Loots, G. P.; Nel, P. P.: Early stages of ciliogenesis in the respiratory epithelium of the nasal cavity of rabbit embryos. In: *Cell and tissue research* 255 (3), S. 589–594.
- (Lucas et al. 2017): Lucas, Jane S.; Barbato, Angelo; Collins, Samuel A.; Goutaki, Myrofora; Behan, Laura; Caudri, Daan et al.: European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. In: *European Respiratory Journal* 49 (1).
- (Lüllmann-Rauch 2009): Lüllmann-Rauch, Renate: Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Taschenlehrbuch).
- (Ma et al. 2019): Ma, Meisheng; Stoyanova, Mihaela; Rademacher, Griffin; Dutcher, Susan K.; Brown, Alan; Zhang, Rui: Structure of the Decorated Ciliary Doublet Microtubule. In: *Cell* 179 (4), 909-922.e12.
- (Manara et al. 2019): Manara, Elena; Paolacci, Stefano; D'Esposito, Fabiana; Abeshi, Andi; Ziccardi, Lucia; Falsini, Benedetto et al.: Mutation profile of BBS genes in patients with Bardet-Biedl syndrome: an Italian study. In: *Italian journal of pediatrics* 45 (1), S. 72.
- (Marshall 2008): Marshall, Wallace F.: Basal bodies platforms for building cilia. In: *Current topics in developmental biology* 85, S. 1–22.
- (Marshall und Rosenbaum 2001): Marshall, W. F.; Rosenbaum, J. L.: Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. In: *J Cell Biol* 155 (3), S. 405–414.
- (McLelland 1991): McLelland, J.: A Color Atlas of Avian Anatomy. 1. Auflage: W.B. Saunders Company.
- (MedlinePlus 2021): MedlinePlus: Bardet-Biedl syndrome: MedlinePlus Genetics. National Institutes of Health / U.S. National Library of Medicine. Online verfügbar unter <https://medlineplus.gov/genetics/condition/bardet-biedl-syndrome/#references>.

- (Menco und Farbman 1987): Menco, B. P.; Farbman, A. I.: Genesis of cilia and microvilli of rat nasal epithelia during prenatal development. III. Respiratory epithelium surface, including a comparison with the surface of the olfactory epithelium. In: *Journal of Anatomy* 152, S. 145–160.
- (Mercey et al. 2019): Mercey, Olivier; Levine, Michelle S.; LoMastro, Gina M.; Rostaing, Philippe; Brotslaw, Eva; Gomez, Valerie et al.: Massive centriole production can occur in the absence of deuterosomes in multiciliated cells 21 (12), S. 1544–1552.
- (Metscher 2009): Metscher, Brian D.: MicroCT for developmental biology: a versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238 (3), S. 632–640.
- (Meunier und Azimzadeh 2016): Meunier, Alice; Azimzadeh, Juliette: Multiciliated Cells in Animals. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (12).
- (Milo et al. 2022): Milo et al.: Red blood cell dimensions (elliptical shape) - Chicken Gallus gallus - BNID 102925. Hg. v. Milo Lab, Weizmann Institute of Science Israel. Online verfügbar unter <https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&v=2&id=102925>.
- (Mirra et al. 2017): Mirra, Virginia; Werner, Claudius; Santamaria, Francesca: Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on Clinical Aspects, Genetics, Diagnosis, and Future Treatment Strategies. In: *Front. Pediatr.* 5, S. 135.
- (Mizuno et al. 2012): Mizuno, Naoko; Taschner, Michael; Engel, Benjamin D.; Lorentzen, Esben: Structural studies of ciliary components. In: *Journal of Molecular Biology* 422 (2), S. 163–180.
- (Mulisch 2014): Mulisch, Maria: Verfahren der Immunlokalisation. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- (Nanjundappa et al. 2019): Nanjundappa, Rashmi; Kong, Dong; Shim, Kyuhwan; Stearns, Tim; Brody, Steven L.; Loncarek, Jadranka; Mahjoub, Moe R.: Regulation of cilia abundance in multiciliated cells. In: *eLife* 8.
- (Nigg und Holland 2018): Nigg, Erich A.; Holland, Andrew J.: Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 19 (5), S. 297–312.
- (Nüßlein et al. 2013): Nüßlein, T.; Brinkmann, F.; Ahrens, P.; Ebsen, M.; Jung, A.; Kirchberger, W. et al.: Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie. In: *Monatsschr Kinderheilkd* 161 (5), S. 406–416.
- (Okuda et al. 2019): Okuda, Kenichi; Chen, Gang; Subramani, Durai B.; Wolf, Monroe; Gilmore, Rodney C.; Kato, Takafumi et al.: Localization of Secretory Mucins MUC5AC and

- MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 199 (6), S. 715–727.
- (Paff et al. 2021): Paff, Tamara; Omran, Heymut; Nielsen, Kim G.; Haarman, Eric G.: Current and Future Treatments in Primary Ciliary Dyskinesia. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (18), S. 9834.
- (Pedersen et al. 2012): Pedersen, Lotte B.; Schrøder, Jacob M.; Satir, Peter; Christensen, Søren T.: The ciliary cytoskeleton. In: *Comprehensive Physiology* 2 (1), S. 779–803.
- (Pellicciari 2018): Pellicciari, Carlo: Histochemistry as a versatile research toolkit in biological research, not only an applied discipline in pathology. In: *European Journal of Histochemistry : EJH* 62 (4).
- (Poole et al. 2001): Poole, C. A.; Zhang, Z. J.; Ross, J. M.: The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. In: *Journal of Anatomy* 199 (Pt 4), S. 393–405.
- (Priya et al. 2016): Priya, Sathya; Nampoothiri, Sheela; Sen, Parveen; Sripriya, S.: Bardet-Biedl syndrome: Genetics, molecular pathophysiology, and disease management. In: *Indian Journal of Ophthalmology* 64 (9), S. 620–627.
- (Quinton 2017): Quinton, Paul M.: Both Ways at Once: Keeping Small Airways Clean. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 32 (5), S. 380–390.
- (Radulescu und Boenisch 2007): Radulescu, Razvan Tudor; Boenisch, Thomas: Blocking endogenous peroxidases: a cautionary note for immunohistochemistry. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 11 (6), S. 1419.
- (Raidt et al. 2020): Raidt, J.; Brillault, J.; Brinkmann, F.; Jung, A.; Koerner-Rettberg, C.; Koitschev, A. et al.: Management der Primären Ciliären Dyskinesie. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 74 (11), S. 750–765.
- (Reinke 2022): Reinke, Alexander: Elektronenmikroskopische und Immunzytochemische Untersuchungen zur Ziliogenese in multiziliären Zellen der Trachea des embryonalen Hühnchens (*Gallus gallus domesticus*). Dissertation. Universität Rostock. Elektronenmikroskopisches Zentrum Rostock.
- (Reiter und Leroux 2017): Reiter, Jeremy F.; Leroux, Michel R.: Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (9), S. 533–547.
- (Rock et al. 2009): Rock, Jason R.; Onaitis, Mark W.; Rawlins, Emma L.; Lu, Yun; Clark, Cheryl P.; Xue, Yan et al.: Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. In: *PNAS* 106 (31), S. 12771–12775.

Literaturverzeichnis

- (Sakakura et al. 1985): Sakakura, Y.; Ukai, K.; Itoh, H.; Saida, S.; Miyoshi, Y.: Cilia injury during virus infection in chickens. In: *Rhinology* 23 (4), S. 283–290.
- (Salomon et al. 2008): Salomon, Franz-Viktor; Geyer, Hans; Gille, Uwe: Anatomie für die Tiermedizin. Atmungsapparat. 2. aktualisierte und erweiterte Auflage: Thieme Verlag (Anatomie für die Tiermedizin).
- (Satir und Christensen 2007): Satir, Peter; Christensen, Søren Tvorup: Overview of structure and function of mammalian cilia. In: *Annual review of physiology* 69, S. 377–400.
- (Saunders et al. 2013): Saunders, Cecil J.; Reynolds, Susan D.; Finger, Thomas E.: Chemosensory brush cells of the trachea. A stable population in a dynamic epithelium. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49 (2), S. 190–196.
- (Seo et al. 2011): Seo, Seongjin; Zhang, Qihong; Bugge, Kevin; Breslow, David K.; Searby, Charles C.; Nachury, Maxence V.; Sheffield, Val C.: A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothed. In: *PLoS genetics* 7 (11), e1002358.
- (Shamsuddin und Quinton 2014): Shamsuddin, A. K. M.; Quinton, Paul M.: Native small airways secrete bicarbonate. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50 (4), S. 796–804.
- (Shamsuddin und Quinton 2019): Shamsuddin, A. K. M.; Quinton, Paul M.: Concurrent absorption and secretion of airway surface liquids and bicarbonate secretion in human bronchioles. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 316 (5), L953–L960.
- (Shapiro et al. 2016): Shapiro, Adam J.; Zariwala, Maimoona A.; Ferkol, Thomas; Davis, Stephanie D.; Sagel, Scott D.; Dell, Sharon D. et al.: Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. In: *Pediatric Pulmonology* 51 (2), S. 115–132.
- (Sigma-Aldrich 2022): Sigma-Aldrich: Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin (T7451) - Data Sheet.
- (Soares et al. 2019): Soares, Helena; Carmona, Bruno; Nolasco, Sofia; Viseu Melo, Luís; Gonçalves, João: Cilia Distal Domain: Diversity in Evolutionarily Conserved Structures. In: *Cells* 8 (2), S. 160.
- (Spassky und Meunier 2017): Spassky, Nathalie; Meunier, Alice: The development and functions of multiciliated epithelia. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 18 (7), S. 423–436.
- (Stern 2005): Stern, Claudio D.: The chick; a great model system becomes even greater. In: *Developmental cell* 8 (1), S. 9–17.

- (Sullenberger et al. 2020): Sullenberger, Catherine; Vasquez-Limeta, Alejandra; Kong, Dong; Loncarek, Jadranka: With Age Comes Maturity: Biochemical and Structural Transformation of a Human Centriole in the Making. In: *Cells* 9 (6).
- (Sun et al. 2019): Sun, Shufeng; Fisher, Rebecca L.; Bowser, Samuel S.; Pentecost, Brian T.; Sui, Haixin: Three-dimensional architecture of epithelial primary cilia. In: *PNAS* 116 (19), S. 9370–9379.
- (Takumi und Kitagawa 2022): Takumi, Kasuga; Kitagawa, Daiju: Experimental and Natural Induction of de novo Centriole Formation. In: *Front. Cell Dev. Biol.* 10, S. 861864.
- (Tilley et al. 2015): Tilley, Ann E.; Walters, Matthew S.; Shaykhiev, Renat; Crystal, Ronald G.: Cilia dysfunction in lung disease. In: *Annual review of physiology* 77, S. 379–406.
- (Ting und Moltke 2019): Ting, Hung-An; Moltke, Jakob von: The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 202 (5), S. 1321–1329.
- (Vollmerhaus et al. 2004): Vollmerhaus, Bernd; Sinowatz, F.; Nickel, Richard; Schummer, August; Seiferle, Eugen: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 5. Kapitel: Atmungsapparat. 3. Auflage. Berlin: Parey (Lehrbuch der Anatomie der Haustiere).
- (Walsh und McLelland 1978): Walsh, C.; McLelland, J.: The development of the epithelium and its innervation in the avian extra-pulmonary respiratory tract. In: *Journal of Anatomy*, S. 171–182.
- (Wheeler und Brändli 2009): Wheeler, Grant N.; Brändli, André W.: Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238 (6), S. 1287–1308.
- (Whewey und Mitchison 2019): Whewey, Gabrielle; Mitchison, Hannah M.: Opportunities and Challenges for Molecular Understanding of Ciliopathies-The 100,000 Genomes Project. In: *Front. Genet.* 10, S. 127.
- (Yanardag und Pugacheva 2021): Yanardag, Sila; Pugacheva, Elena N.: Primary Cilium Is Involved in Stem Cell Differentiation and Renewal through the Regulation of Multiple Signaling Pathways. In: *Cells* 10 (6), S. 1428.
- (Zarbock 2021): Zarbock: Bardet-Biedl-Syndrom: Labor & Diagnostik. Online verfügbar unter <https://www.medizinische-genetik.de/diagnostik/humangenetik/augenerkrankungen/bardet-biedl-syndrom>.
- (Zerres 2010): Zerres, K.: Ziliopathien im Blickpunkt. In: *medgen* 22 (3), S. 313–314.

Literaturverzeichnis

(Zhao et al. 2019): Zhao, Huijie; Chen, Qingxia; Fang, Chuyu; Huang, Qiongpeng; Zhou, Jun; Yan, Xiumin; Zhu, Xueliang: Parental centrioles are dispensable for deuterosome formation and function during basal body amplification. In: *EMBO reports* 20 (4), e46735.

(Zhao et al. 2022): Zhao, Huijie; Khan, Ziam; Westlake, Christopher J.: Ciliogenesis membrane dynamics and organization. In: *Seminars in cell & developmental biology*.

8. Anhang

8.1 Protokolle

Protokoll 1

Herstellung von Phosphate-buffered saline (PBS) 10x und 1x

Die PBS Herstellung erfolgt gemäß dem institutsinternen Protokoll des EMZ Rostock.

Material:

1. NaCl (MW: 58,44 g/mol)
2. KCl (MW: 75,56 g/mol)
3. Na₂HPO₄ * 2H₂O (MW: 177,99 g/mol)
4. KH₂PO₄ (MW: 136,09 g/mol)

Durchführung:

10x PBS: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na₂HPO₄ Dihydrat, 2g KH₂PO₄ Monohydrat, auf 1l mit Aqua dest. auffüllen (pH 7,4). Lagerung im Kühlschrank.

1x PBS: 100ml 10x PBS auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen

Bemerkung:

Bei 10x PBS kann es durch Aufbewahrung im Kühlschrank zu Kristallbildungen kommen. Vor Gebrauch erneut lösen.

Protokoll 2

Herstellung von Paraformaldehyd (PFA) Fixativ – 4% PFA in PBS

Die PFA Fixativ Herstellung erfolgt gemäß dem institutsinternen Protokoll des EMZ Rostock.

Material:

- (1) 30 ml 10xPBS
- (2) 12 g Paraformaldehyd (Pulver)
- (3) 300 ml Aqua dest.

Durchführung:

- (1) 12g Paraformaldehyd (Pulver) in ca. 250 ml Aqua dest. abwiegen
- (2) Für mindestens eine Stunde unter kontinuierlichem Rühren auf 60 bis 70°Celsius erwärmen und lösen bis die Lösung eine milchige Färbung annimmt
- (3) Durch vorsichtige tropfenweise Zugabe von 10 n (normaler) Natronlauge wird die Lösung unter ununterbrochenem Rühren geklärt.
- (4) 30 ml 10xPBS zugeben.
- (5) Bis 300 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Bemerkung:

Alle Schritte sind unter einem Abzug durchzuführen!

Protokoll 3

Entwässern der Proben mit Aceton und KPT

Entwässern mit Aceton:

Proben befinden sich nach der Probenpräparation im Probenrondell mit PBS.

- | | |
|-----------------|------------------|
| 1. 30 % Aceton | 5 Minuten |
| 2. 50 % Aceton | 10 Minuten |
| 3. 70 % Aceton | 20 Minuten |
| 4. 90 % Aceton | 20 Minuten |
| 5. 100 % Aceton | 60 Minuten |
| 6. 100 % Aceton | 12h (über Nacht) |

Durchführung KPT:

Die KPT erfolgt gemäß dem institutsinternen Protokoll des EMZ Rostock.

1. Vor Beginn überprüfen, ob alle Ventile an der Trocknungsanlage und der CO₂- Flasche geschlossen sind.
2. Netzschalter betätigen
3. Die Heizung muss ausgeschaltet sein!
4. CO₂-Flaschenventil langsam öffnen.
5. Ventil „COOL“ langsam öffnen und mit konstantem Gasstrom die Kammer auf +5°C herunterkühlen. Dabei den Deckel darauflegen, damit er auch abkühlt.
6. Sind +8° C erreicht, Ventil „COOL“ schließen. Die Kammertemperatur sinkt um 2,5° C weiter bis auf ca. +5° C.
7. Probenhalter in die Kammer stellen und Deckel fest verschließen. Dabei darauf achten, dass die Proben nicht austrocknen. Im Zweifel Entwässerungsmittel in Kammer vorlegen, damit die Proben nicht trocken fallen. (Eventuell nachkühlen.)
8. Ventil „INLET“ öffnen und Probenkammer mit flüssigem CO₂ füllen. Achtung: der Flüssigkeitspegel erscheint sehr schnell! Daher muss das Ventil vorsichtig geöffnet und das Sichtfenster der Kammer sofort genau beobachtet werden. Der richtige Füllstand ist erreicht, wenn der Flüssigkeitspegel im oberen Drittel des Kammer Sichtfensters erscheint. Temperatur überprüfen und ggf. auf +5° C nachkühlen (Öffnen des Ventils „COOL“).
9. Nach 3 min (in dieser Zeit die Temperatur mit dem COOL- Ventil auf +5° C halten) Ventil „EXHAUST“ öffnen und CO₂ bis zum unteren Fensterrand ablassen.
10. Ventil „EXHAUST“ schließen und Punkt 8 und 9 noch 2x wiederholen
11. Nach dem letzten Ablassen Geruchskontrolle am Gasauslass, ob Gas noch Spuren von Ethanol oder Aceton enthält. Falls ja, Punkt 8 und 9 nochmals wiederholen.

12. Die Kammer nun wieder mit CO₂ füllen (Ventil „INLET“) und danach Heizung an der Vorderseite des Gerätes einschalten.
13. CO₂-Flasche schließen.
14. Nach kurzer Verzögerung steigt die Temperatur in der Kammer bis über den kritischen Punkt von 35°C an. Das System benötigt dafür ca. 15min. Der Flüssigkeitsspiegel sinkt während dieser Zeit langsam ab und pegelt sich etwa auf der Mitte des Sichtfensters ein. Bei einer Temperatur von 30°C und einem Kammerdruck von 1100 psi verschwindet der Meniskus (das flüssige CO₂ wandelt sich schlagartig in gasförmiges um = kritischer Punkt).
15. Die Temperaturkontrolle schaltet jetzt die Heizung nach Bedarf aus bzw. ein und regelt die Temperatur im Bereich von +32°C bis +38°C. Der Kammerinnendruck liegt dabei im Bereich von 1200 bis 1300 psi.
16. Die Kammer kann nun mit Hilfe des Ventils „BLEED“ vorsichtig belüftet werden. Der Pegel der Flussanzeige sollte sich dabei zwischen 0,5 und 1 L/min bewegen.
17. Wenn der Kammerdruck auf 0 psi gefallen ist (Druckausgleich), werden alle anderen Ventile geöffnet sowie die Heizung ausgeschaltet. Die Probenkammer kann nun geöffnet werden.
18. Wird das Gerät nicht weiter benötigt, muss es über den Netzschalter auf der Rückseite ausgeschaltet werden.

Protokoll 4 Besputtern

Das Besputtern erfolgt gemäß dem institutsinternen Protokoll des EMZ Rostock.

Material:

Argonflasche, BAL-TEC SCD 004 Sputter Coater

Durchführung:

1. Argon-Flasche $\frac{1}{4}$ Umdrehung öffnen.
2. „Gas“-Ventil vorsichtig öffnen. Der Fluss wird im Steigrohr sichtbar. Das Ventil bis auf 5 öffnen und so lassen. Der Anzeiger sinkt langsam wieder ab. (Druckausgleich)
3. Wenn der Anzeiger nicht mehr sichtbar ist, dann kann die Klappe zur Kammer mit festem Griff geöffnet werden. Achtung: Die Klappe nach hinten oben öffnen und prüfen ob die Gasdruckfeder sie sicher vor dem Herabfallen hält.
4. Die Probenhalter auf die Platte stellen und dabei die Nummerierung beachten.
5. Die Proben sollten sich ca. auf der Höhe von 35 mm befinden
6. Die Klappe mit Gefühl auf die Gummidichtung schließen.
7. Nun mit der linken Hand die Klappe zu drücken, mit der rechten das Ventil „Gas“ schließen und die Vakuumpumpe mit dem grünem Schalter einschalten.
8. Nun fällt der Druck in der Kammer, sichtbar am roten Balken von rechts nach links (10^{-3} mbar).
9. Jetzt den Count-down-Timer auf 50s stellen, warten bis das Vakuum aufgebaut ist und der rote Balken ganz links bei 10^{-3} mbar zu sehen ist.
10. Nun mit dem Gas-Ventil langsam Argon wieder einlassen bis der rote Balken zwischen den schwarzen Markierungen steht. (zwischen 5×10^{-2} und 7×10^{-2} mbar)
11. Den Sputter-Strom mit „Current“ auf 20 mA einstellen (ca. $\frac{1}{2}$ Umdrehung) und schnell auf „Start“ drücken.
12. Jetzt läuft die Zeit rückwärts, dabei den Sputter-Strom auf 20 mA halten
13. Wenn die Zeit abgelaufen ist, den Sputter-Strom wieder auf Null stellen und das Gerät mit dem grünen Schalter ausstellen.
14. Nun das Gas-Ventil wieder öffnen bis der Schwimmer auf 5 steht und so lassen.
15. Wenn der Schwimmer nicht mehr sichtbar ist, kann die Klappe vorsichtig geöffnet werden.
16. Nun die Proben herausnehmen und das Gas-Ventil des Sputter-Gerätes und die Argon Flasche schließen.
17. Abschließend Gerätedeckel wieder verschließen, zudrücken und die Pumpe bis ein Vakuum von 10^{-3} mbar wieder erreicht ist einschalten.
18. Gerät abschließend ausschalten

Protokoll 5 Paraffin-Einbettung

Die Einbettung in Paraffin erfolgt gemäß dem institutsinternen Protokoll des EMZ Rostock.

1. Proben bei 4°C in 4% PFA-Fixativ für mehrere Tage (nach Sicht)
2. Waschen in PBS 3x
3. 50% Ethanol mindestens 2h
4. 70% Ethanol mindestens 2h
5. 80% Ethanol mindestens 2h
6. 90% Ethanol mindestens 2h
7. 100% Ethanol mindestens 2h
8. 100% Ethanol über Nacht
9. 100% Ethanol/ Roti-Histol® 1:1 für mindestens 4h
10. Roti-Histol® I über Nacht
11. Roti-Histol® II für mindestens 4h
12. Paraffin I über Nacht bei 62°C
13. Paraffin II-IV jeweils 4h bei 62°C
14. Paraffin V Ausgießen in Blöcke

Protokoll 6

Immunzytochemische Färbung mit ac-Tub

Deparaffinierung und Rehydrierung:

- 2x ROTI® Histol für 5Min
- 100% EtOH 2x 5Min, 75% EtOH 3Min, 50% EtOH 3Min, 25% EtOH 2Min
- Spülen in Aqua dest.
- PBS für 10Min
- PBST für 5Min

Peroxidase Quenching:

- 0,3%ige H₂O₂ Lösung für 10Min: 1,7ml 35%iges H₂O₂ in 200ml PBST
- Im alten PBST waschen
- PBST (neu) für 5Min

Feuchte Kammer vorbereiten:

- Tücher falten und in Kammer reinlegen und mit Aqua dest. benetzen
- Objektträger abklopfen und vorsichtig an den Rändern abstreichen, nicht die Proben berühren

Blocken in feuchter Kammer:

- Blockpuffer: Ziegenserum (*engl. Normal Goat Serum*) 5%ig und PBST im Verhältnis 1:10 für 30 min

Primärantikörper:

- Blockpuffer von Objektträgern abpipettieren (Nicht von Kontrollen!)
- Primärantikörper mit Blockpuffer verdünnen (1:10.000) und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubieren
- 3x PBS für 5Min

Sekundärantikörper

- Sekundärer biotinylierter AK (Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Biotinylated - BA-9200) für 60 Min, Konzentration 1:200 (in PBST verdünnen)
- 2x10 Min. in PBST waschen

ABC-Reagens

- Streptavidin-Peroxidase Komplex (ABC reagent, Vector PK-4000) vorbereiten, dazu Komponenten A und B je 1:100 in PBS verdünnen (CAVE: Komplex mindestens 30 Min. vor Gebrauch ansetzen!)
- ABC-Reagens für 60 Min
- 2x in PBS waschen für 3 Min.

DAB

- 2 ml DAB-Konzentrat + 18 ml PBS, zunächst ohne H₂O, auf Schnitte auftragen für ca. 3 Min. (negativ-keine Reaktion) nur vorsichtig wieder absaugen (feucht lassen).
- danach 3.3µl H₂O₂ je 10 ml zur DAB-Lösung hinzufügen, mischen, dann auf Schnitte auftragen, positive Reaktion für 7 Min
- 3x mit PBS waschen und absaugen (alle Lösungen Sonder-Abfall DAB KMR-Stoff)
- Aqua dest. für 1-2 Min. waschen (kann dort auch länger stehen bleiben)

Ggf. Gegenfärbung mit der H&E Färbung

(siehe dazu Protokoll 5 ab dem Schritt H&E Lösung 1)

Protokoll 7 H&E Färbung

Roti-Histol® I	5 Min.
Roti-Histol® II	5 Min.
100% Ethanol	3 Min.
100% Ethanol	3 Min.
75% Ethanol	2 Min.
50% Ethanol	2 Min.
H ₂ O destilliert	5 Min.
H&E Lösung I	6 Min.
Leitungswasser	10 Sek.
HCL 0,1%	10 Sek.
Fließendes H ₂ O	6 Min.
H&E Lösung II	30 Sek.
Fließendes H ₂ O	30 Sek.
H ₂ O destilliert	1 Min.
50% Ethanol	10 Sek.
70% Ethanol	10 Sek.
100% Ethanol	10 Sek.
Roti-Histol® I	5 Min.
Roti-Histol® II	5 Min.

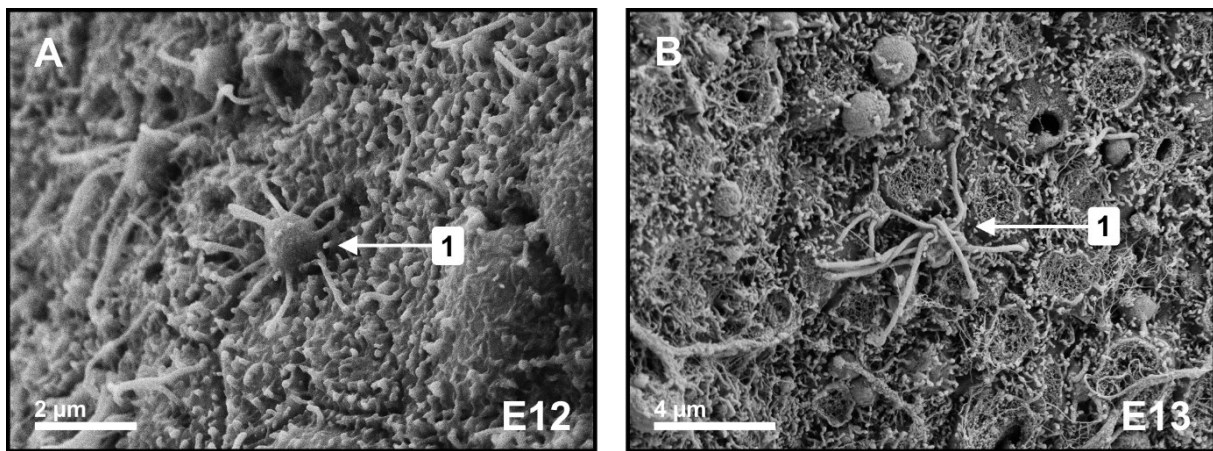
Eindeckeln mit Roti-Histokitt®

8.2 Besondere Aufnahmen der Nasenhöhle

Neben dem faszinierenden respiratorischen Epithel in der Nasenhöhle existiert bekanntermaßen eine zweite Epithelart, das olfaktorische Epithel, in direkter Nachbarschaft zu diesem. Für Forschende im Bereich des olfaktorischen Epithels und alle weiteren Interessenten mögen die Bilder in diesem Kapitel als Inspiration dienen.

Die folgenden Bilder zeigen olfaktorische sensorische Neurone, auf der Concha nasalis caudalis, in frühen embryonalen Stadien des Haushuhns (E12 und E13).

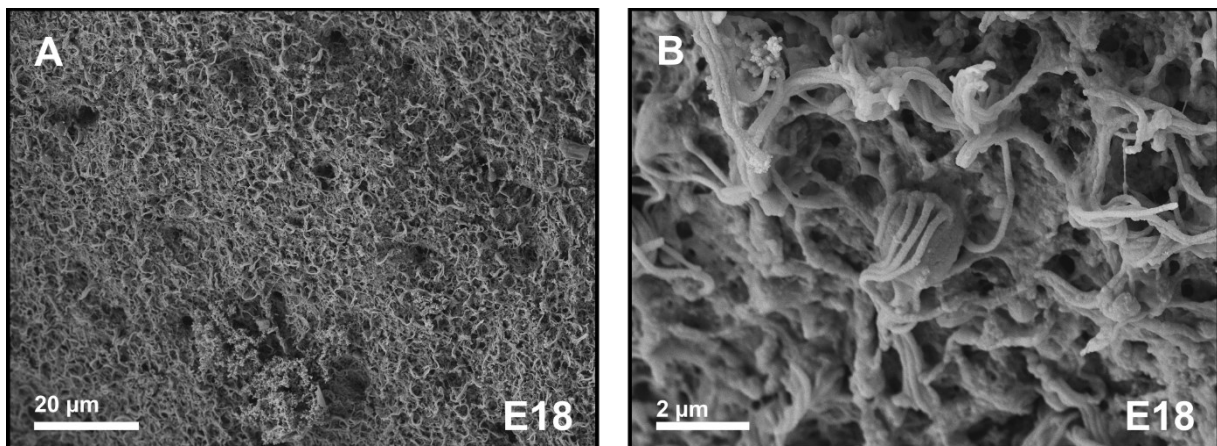
Olfaktorische Sensorische Neurone



Beschreibung: REM - Olfaktorisches Epithel der Stadien E12 und E13; 1 = dendritischer Kolben mit den Zilien;
Quelle: eigene Darstellung

Im Gegensatz zur Entwicklung des respiratorischen Epithels sind die Zilien des olfaktorischen Epithels bereits im Stadium E12 und E13 mit einer Länge bis zu 6 µm nachweisbar.

Olfaktorisches Epithel



Beschreibung: REM - Olfaktorisches Epithel im Stadium E18; Quelle: eigene Darstellung

8.3 Veröffentlichungen

Abstracts

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

Poster

S. Reinke, A. Reinke, M. Frank: Electron microscopic analysis of the development of multiciliated cells in the respiratory epithelium of the concha nasalis media in the chicken embryo. Microscopy Conference MC2021 (Dreiländertagung), Joint Meeting of Dreiländertagung & Multinational Congress of Microscopy, 22-26 August 2021, www.mc2021.at

8.4 Lebenslauf

Sebastian Reinke, geboren am 28.01.1998 in Schwerin

Promotionsarbeit

seit 01/2018

„Entwicklung des Flimmerepithels der Nasenhöhle - rasterelektronenmikroskopische und immunzytochemische Untersuchungen am embryonalen Haushuhn“.

Promotionsarbeit am Elektronenmikroskopischen Zentrum Rostock unter der Leitung von PD Dr. sc. nat. Markus Frank

Hochschulstudium und Schulbildung

11/2021 – 10/2022 Praktisches Jahr
3. Tertial: Radiologie Universitätsmedizin Rostock
2. Tertial: Innere Medizin (Kardiologie), Helios Kliniken Schwerin
1. Tertial: Chirurgie (Neuro- und Wirbelsäulenchirurgie und Allgemein- und Visceralchirurgie), Helios Kliniken Schwerin
10/2021 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: gut
09/2018 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note schriftlich: gut, Note mündlich: gut
10/2016 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Rostock
07/2016 Abitur (Note 1,0 mit Punktzahl 841)
08/2010 – 07/2016 7. bis 12. Klasse Gymnasium am Sonnenberg Crivitz
09/2008 – 07/2010 5. bis 6. Klasse Goethe-Gymnasium Schwerin
08/2004 – 07/2008 1. bis 4. Klasse ORI-Grundschule Leezen

Preise und Auszeichnungen

07/2016 Auszeichnung des Schulleiters als Jahrgangsbester des Abiturjahrgangs 2016 mit einer Abiturnote von 1,0
07/2016 Abiturpreis der DPG (Deutsche Physikalische Gesellschaft) für hervorragende Leistungen im Fach Physik

Stipendien

Stipendiat der Glemser Stiftung for Future Excellency
Stipendiat der e-fellows.net Stiftung

Außercurriculare Aktivitäten

2019 Programmierung der App „WeSeniMuS“ für das Anatomische Institut Rostock zur Forschung im Bereich der multiplen Sklerose
Hobbys Informatik (Programmierung und Hardware, PC-Bau und Tuning), Sport: Tennis (MV Landesmeister von 2013)

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache
Englisch Verhandlungssicher in Wort und Schrift
Latein Grundkenntnisse

8.5 Danksagung

Den Möglichkeiten in der elektronenmikroskopischen Forschung sind keine Grenzen gesetzt. Dies habe ich in meinen Jahren am EMZ Rostock gelernt.

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei PD Dr. sc. nat. Markus Frank bedanken, welcher mir als Doktorvater und Leiter des Elektronenmikroskopischen Zentrums der Universitätsmedizin Rostock eine Forschungsarbeit mit tiefen Einblicken in die Welt der elektronenmikroskopischen und lichtmikroskopischen Grundlagenforschung ermöglicht hat. Ebenfalls bedanke ich mich für die Möglichkeit, dass ich mit den Forschungsergebnissen dieser Dissertation an der Mikroskopischen Konferenz 2021 teilnehmen durfte. Diese Erfahrung hat mich persönlich sehr bereichert.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Armin Springer und bei Frau M. Sc. Karoline Schulz bedanken. Als jahrelange Mitarbeiter am EMZ Rostock, haben sie mich an ihrem umfangreichen Wissensschatz über die Rasterelektronenmikroskopie teilhaben lassen und standen mir bei allen Fragen rund um die Probenaufbereitung und die Bedienung des REM-Gerätes in Rat und Tat zur Seite.

Des Weiteren möchte ich mich Frau Ute Schulz bedanken, welche mir als leitende MTA erste Einblicke in die Möglichkeiten der lichtmikroskopischen Probenaufbereitung sowie eine generelle Einführung in der Handhabung von Laborutensilien gab.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Ohne eure bedingungslose Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Ich habe mich sehr gefreut, dass ich mit meinem Bruder, Alexander, am EMZ Rostock an dem gemeinsamen Forschungsprojekt der Zilienforschung im respiratorischen Epithel teilnehmen durfte. So blicke ich voller Freude und Stolz auf viele gemeinsame Mikroskopie-Sessions in der Elektronenmikroskopie Rostock zurück. Diese Erlebnisse haben unsere Beziehung zueinander weiterhin vertieft und auch unser wissenschaftliches Interesse in dieselben Bahnen gelenkt.

8.6 Eidesstattliche Erklärung

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

08.07.2022

(Abgabedatum)

Sebastian Reinke

(Vollständige Unterschrift)