

Die frühe Differenzierung des chordanahen Bindegewebes.

Raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an Hühnerembryonen

The Early Differentiation of the Perinotochordal Connective Tissue. A Scanning and Transmission Electron Microscopic Study on Chick Embryos

Experimentelle Untersuchungen zur Differenzierung des Axialskelets haben ergeben, dass die Chondrogenese in den Wirbelanlagen von der Anwesenheit des Neuralrohres und der Chorda abhängt (HOLTZER und DETWILER¹, STRUDEL², CHRIST³). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Chondrogenese durch das Neuralrohr und die Chorda induziert wird (LASH et al.⁴, STRUDEL⁵). Da die Suche nach einem spezifischen knorpelinduzierenden Faktor bisher nicht den gewünschten Erfolg hatte, andererseits aber nachgewiesen werden konnte, dass extrazelluläres Material wie Kollagen und Glycosaminoglycane Wechselwirkungen zwischen Geweben vermitteln (GROBSTEIN⁶), wie es z.B. für die vertebrale Chondrogenese von STRUDEL⁷, MINOR⁸ und KOSHER und LASH⁹ angenommen wird, ist die Entwicklung des embryonalen Bindegewebes zu einem zentralen embryologischen Problem geworden.

Den bisherigen histochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Entwicklung des perichordalen Bindegewebes kann entnommen werden, dass die Chorda des Hühnchens von der Mitte des 2. Bebrütungstages an Mikrofibrillen und Glycosaminoglycane synthetisiert (O'CONNELL und LOW¹⁰, RUGGERI¹¹, CARLSON et al.¹²). Über das extrazelluläre Material im Bereich der chordanahen Somitenzellen (bzw. Sklerotomzellen) liegen jedoch nur wenige Befunde vor. RUGGERI¹¹ nimmt an, dass frühestens zu Beginn des 4. Bebrütungstages extrazelluläres Material aus der Chordascheide zu den Sklerotomzellen diffundiert und damit die Differenzierung des sekundären Mesenchyms einleitet.

In der vorliegenden Untersuchung soll die Verteilung und Anordnung von Bindegewebelementen im perichordalen Raum junger Hühnerembryonen dargestellt werden.

2 und 3 Tage alte Hühnerembryonen wurden in 3%

Glutaraldehyd in 0,12 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) fixiert, in Hanks-Lösung (pH 7,4) gespült und in 1% Osmiumtetroxyd nachfixiert. Nach der Entwässerung wurden die Präparate entweder in Durcupan ACM (Fluka) eingebettet oder für die Rasterelektronenmikroskopie nach der «Critical-point»-Methode (COHEN et al.¹³) getrocknet. Von den getrockneten Präparaten wurden Querbrüche hergestellt oder das Mesenchym wurde von der Ventralseite her freipräpariert; anschließend wurden sie in der Kathodenzerstäubungsanlage mit einem Goldfilm beschichtet. Die Untersuchungen wurden durchgeführt am Siemens Elmiskop 1A und am Rasterelektronenmikroskop Jeol JSM 35.

Am Ende des 2. Bebrütungstages (St. 12 nach HAMBURGER und HAMILTON¹⁴) sind die Somiten noch bläs-

¹ H. HOLTZER und S. R. DETWILER, *J. exp. Zool.* 123, 335 (1953).

² G. STRUDEL, *Archs Anat. microsc. Morph. exp.* 44, 209 (1955).

³ B. CHRIST, *Anat. Anz., Erg.-H. zu Bd. 126*, 555 (1970).

⁴ J. W. LASH, S. HOLTZER und H. HOLTZER, *Expl Cell Res.* 13, 292 (1957).

⁵ G. STRUDEL, *Devel. Biol.* 4, 67 (1962).

⁶ C. GROBSTEIN, *Epithelial-Mesenchymal Interactions* (Eds. R. FLEISCHMAYER und R. E. BILLINGHAM; Williams und Wilkins, Baltimore 1968), p. 173.

⁷ G. STRUDEL, *Ann. Biol.* 12, 26 (1973).

⁸ R. R. MINOR, *J. Cell Biol.* 56, 27 (1973).

⁹ R. A. KOSHER und J. W. LASH, *Devel. Biol.* 42, 362 (1975).

¹⁰ J. J. O'CONNELL und F. N. LOW, *Anat. Rec.* 167, 425 (1970).

¹¹ A. RUGGERI, *Z. Anat. Entwicklgesch.* 138, 20 (1972).

¹² E. C. CARLSON, R. H. UPSON und D. K. EVANS, *Anat. Rec.* 179, 361 (1974).

¹³ A. L. COHEN, D. P. MARLOW und G. GARNER, *J. Microsc.* 7, 331 (1968).

¹⁴ V. HAMBURGER und H. L. HAMILTON, *J. Morph.* 88, 49 (1951).

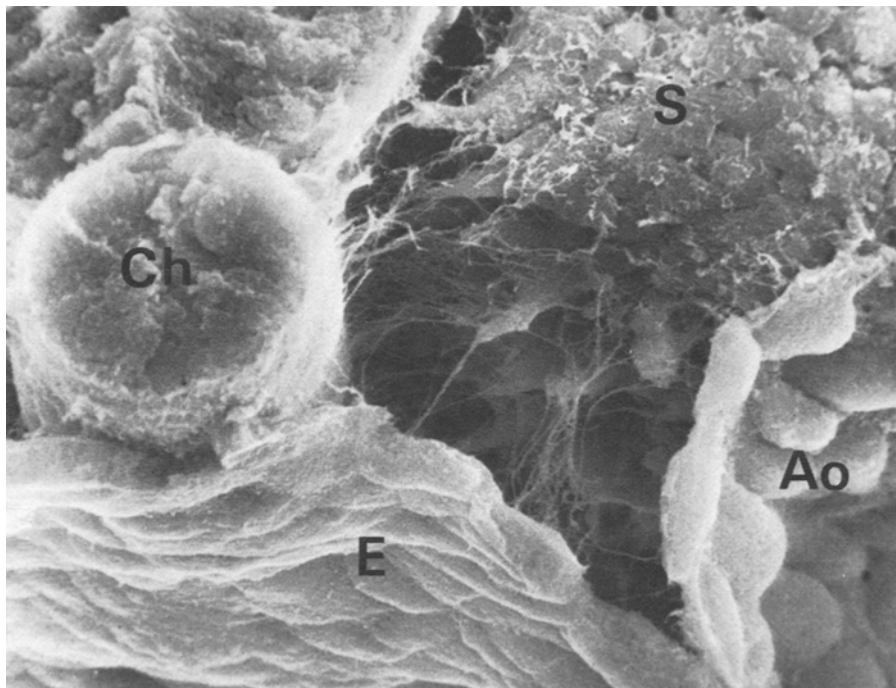


Fig. 1. Querbruch durch einen 2 Tage alten Hühnerembryo. Ch, Chorda; S, Somit; Ao, Aorta; E, Entoderm. Ca. 2000:1.

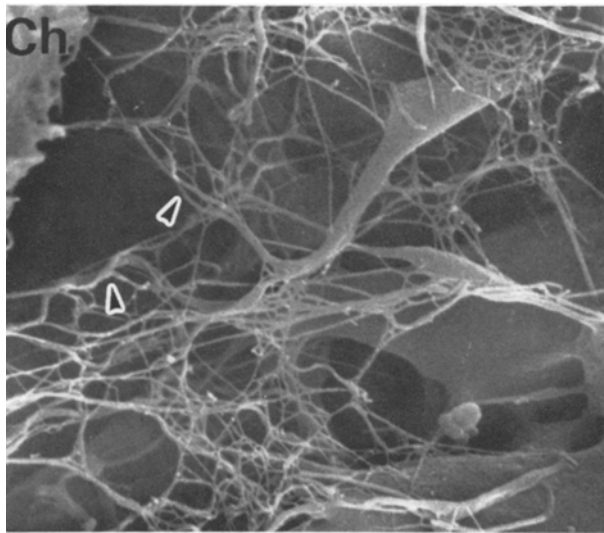


Fig. 2. Perichordaler Raum eines 2 Tage alten Hühnerembryos. Ch, Chorda; Pfeile: Filopodien. Ca. 5000:1.

chenförmig, die Chorda ist zylindrisch. Lichtmikroskopisch erscheint der perichordale Raum leer. Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskopes ist jedoch zu erkennen, dass von den Somitenzellen dünne fädige Strukturen zu den angrenzenden Geweben: Chorda, Neuralrohr und Entoderm ziehen (Figur 1). Wie eine höhere Vergrößerung zeigt (Figur 2), handelt es sich dabei einmal um Aufzweigungen der Somitenzellen in zarte Filopodien, zum anderen um Mikrofibrillen, die zu einem lockeren Maschenwerk angeordnet sind, das von den Filopodien

durchzogen wird. Ein Schnitt durch einen Embryo ebenfalls im St. 12 belegt (Figur 3), dass Fortsätze der Somitenzellen die Basalmembran der Somiten durchbrechen können und wie hier abgebildet in Richtung auf die Chorda ziehen. Einzelne Mikrofibrillen und daran angelagert elektronendichte, aus flockigem Material bestehende Körperchen («interstitial bodies» nach Low¹⁵) sind in der Nähe der Zellfortsätze nachweisbar.

Ein dichtes Netz von Mikrofibrillen findet sich um die Chorda herum unmittelbar aussen an ihre Basalmembran angrenzend (Figur 1). Diese nach Ausweis von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen um 100 Å dicke Mikrofibrillen werden nach den Befunden von RUGGERI¹¹ sowie CARLSON et al.¹² vom 2. Bebrütungstag an von der Chorda produziert.

Dass das sekundäre Mesenchym bereits zu diesem Zeitpunkt über dünne Zellfortsätze mit der Chordascheide in Kontakt kommt, steht im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen nach denen erst am 4. Bebrütungstag, wenn die Sklerotomzellen auf die Chorda zuwandern, das sekundäre Mesenchym Kontakt mit der Chorda aufnimmt (O'CONNELL und LOW¹⁰). Weiterhin ergibt die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung, dass die Quantität des extrazellulären Materials insbesondere die der Mikrofibrillen wesentlich grösser ist als es transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen vermuten lassen. Unsere Befunde stehen damit im Widerspruch zu der Annahme RUGGERI's¹¹, dass die Sklerotomzellen bis zum Ende des 3. Bebrütungstages nicht von Mikrofibrillen umgeben sind. Auch der Darstellung MINOR's⁸, dass bis zum St. 18 die Sklerotomzellen von der Chordascheide durch einen 4–10 µm weiten Spalt getrennt sind, der fast

¹⁵ F. N. Low, *Am. J. Anat.* 128, 45 (1970).

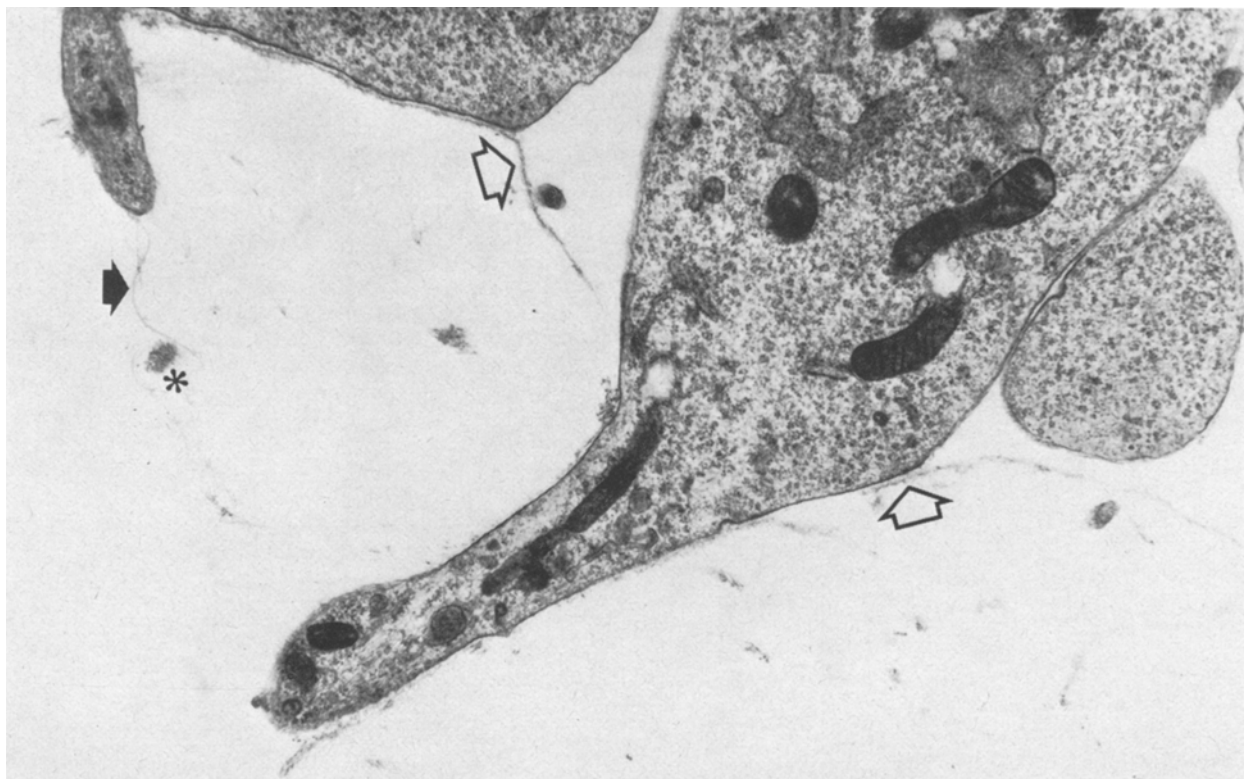


Fig. 3. Querschnitt durch die chordanahen Somitenzellen eines 2 Tage alten Hühnerembryos. Schwarz gerandete Pfeile: Basalmembran der Somiten; schwarzer Pfeil: Mikrofibrille; Stern: «interstitial body». Ca. 16000:1.

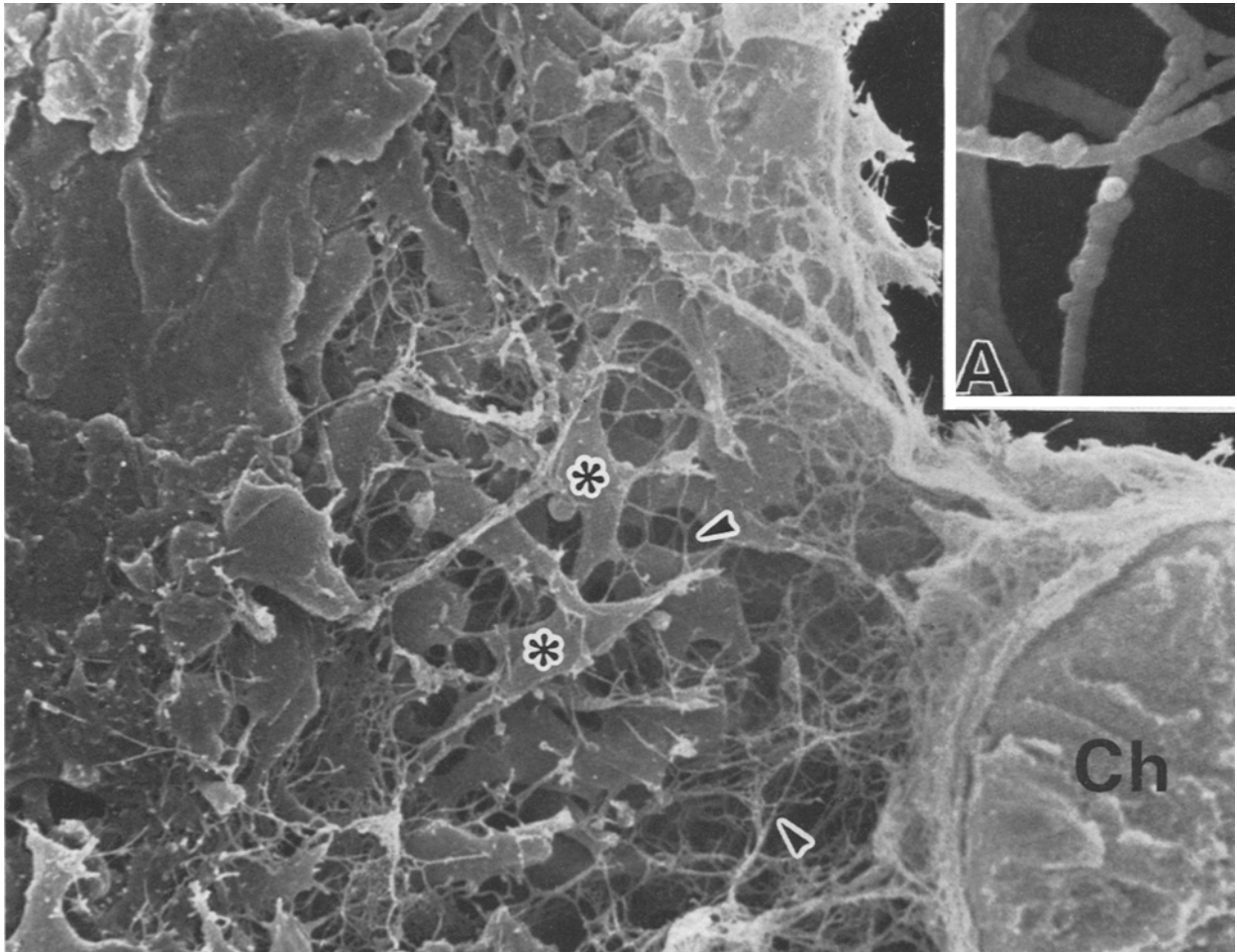


Fig. 4. Querbruch durch einen 3 Tage alten Hühnerembryo. Ch, Chorda; Sterne: Sklerotomzellen; Pfeile: Fibrillen. Ca. 2000:1. A) Ausschnittvergrößerung aus der Mitte von Figur 4 mit Fibrillen. Ca. 26000:1.

keine «strukturelle Matrix» enthält, können wir nicht zustimmen.

Am Ende des 3. Bebrütungstages sind in dem hier dargestellten Bereich die Somiten in Dermatome, Myotome und Sklerotome gegliedert. Im Rasterpräparat (Figur 4) ist um die Chorda herum ein dichter Filz von Fibrillen zu erkennen. Feine Fortsätze der verzweigten Sklerotomzellen verbinden benachbarte Zellen miteinander oder reichen bis an die fibrilläre Chordascheide heran. Durch den relativ weiten Interzellularraum ziehen Fibrillen, die sich entweder überkreuzen oder streckenweise gebündelt verlaufen. Im Gegensatz zu den Zellfortsätzen sind die Fibrillen durch unregelmäßige Auftreibungen, möglicherweise Anlagerungen von «interstitial bodies», die nach COHEN und HAY¹⁶ einen besonderen Mucopolysaccharid-Protein-Komplex darstellen, gekennzeichnet (Figur 4A). Nicht nur die Fibrillen der Chordascheide sondern auch die Fibrillen innerhalb des Sklerotoms sind etwa 250 Å dick und lassen eine deutliche Querstreifung erkennen (Figur 5). Sie gleichen denen, die von JOHNSON et al.¹⁷ in der Herzgallerte und von COHEN und HAY¹⁶ in der unmittelbaren Umgebung des Neuralrohres an 2–3 Tage alten Hühnerembryonen beschrieben werden. Nach JOHNSON et al.¹⁷ bestehen diese Fibrillen aus Kollagen vom Typ I. FREDERICKSON und LOW¹⁸ weisen in der Chordascheide 3 Tage alter Hühnerembryonen 200 Å dicke Fibrillen mit einer Querstreifung nach, die im Gegensatz zu den dünnen Mikrofibrillen durch Kollagenase

verdaut werden sollen. Aufgrund der Markierung mit ³H-Prolin und des enzymatischen Abbaus durch Kollagenase nehmen BAZIN und STRUDEL¹⁹ ebenfalls an, dass das fibrilläre Material im Bereich der Axialorgane Vorstufen von kollagenen Fasern darstellt.

Auf die Herkunft des extrazellulären Materials innerhalb des Sklerotoms kann das transmissionselektronenmikroskopische Bild (Figur 6) Hinweise geben. Die chordanahen Sklerotomzellen des 3 Tage alten Hühnerembryos enthalten einen ausgedehnten Golgi-Komplex mit zahlreichen Vesikeln, cisternenartig erweiterte Schläuche des endoplasmatischen Retikulums, die mit einem filamentösen und granulären Material gefüllt sind sowie voluminöse Mitochondrien. Nach MERKER und STRUWE²⁰ ist diese Ultrastruktur Ausdruck dafür, dass diese Zellen sowohl fibrilläres Material als auch Glycosaminoglycane synthetisieren. Hiermit werden die Befunde von RUGGERI¹¹ bestätigt, dass vom St. 17 an die Sklerotomzellen strukturellen Modifikationen unterliegen. Nach STRUDEL⁷ weisen die chordanahen Sklerotomzellen am Ende des 4. Bebrütungstages Merkmale einer gesteigerten Synthese-

¹⁶ A. M. COHEN und E. D. HAY, *Devel. Biol.* 26, 578 (1971).

¹⁷ R. C. JOHNSON, F. J. MANASEK, W. C. VINSON und J. M. SEYER, *Devel. Biol.* 36, 252 (1974).

¹⁸ R. G. FREDERICKSON und F. N. LOW, *J. Anat.* 130, 347 (1971).

¹⁹ S. BAZIN und G. STRUDEL, *C. r. Acad. Sci., Paris* 275, 1167 (1972).

²⁰ H. J. MERKER und K. STRUWE, *Z. Zellforsch.* 115, 212 (1971).

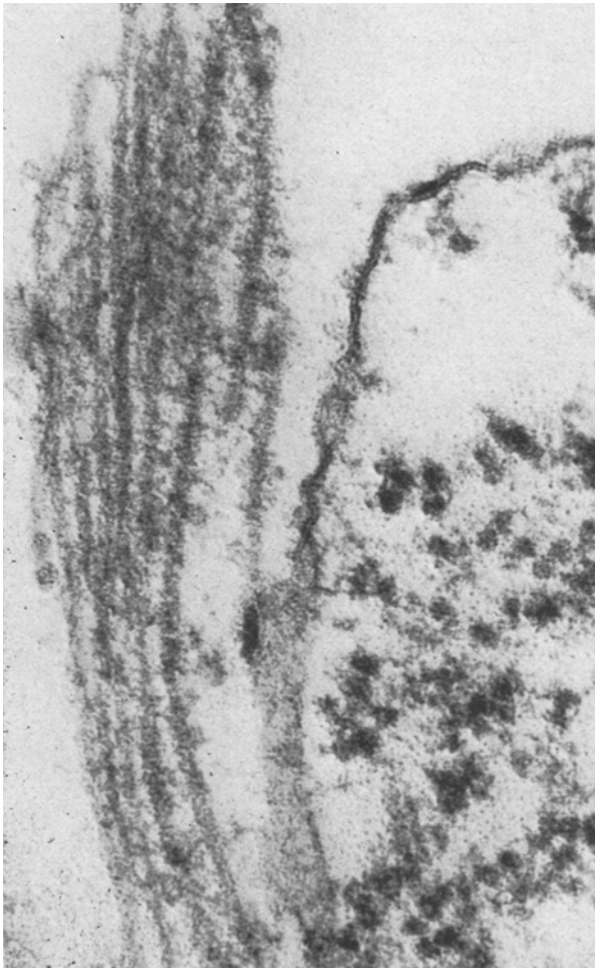


Fig. 5. Fibrillenbündel an einer Sklerotomzelle eines 3 Tage alten Hühnerembryos. Beachte die Querstreifung. Ca. 130000:1.

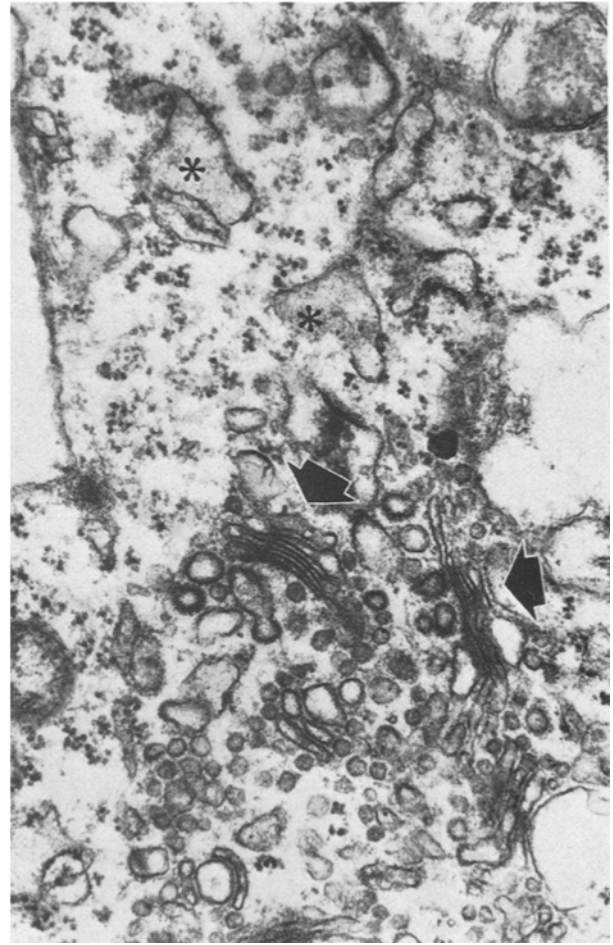


Fig. 6. Zytoplasma einer chordanahen Sklerotomzelle eines 3 Tage alten Hühnerembryos. Pfeile: Golgi-Komplex; Sterne: erweiterte Schläuche des RER. Ca. 55000:1.

leistung auf. Dagegen kommt MINOR⁸ zu dem Schluss, dass erst am 6. Bebrütungstag im Sklerotom Zellen mit grossen Golgi-Vakuolen und erweiterten Cisternen des RER nachweisbar sind.

Nach Ergebnissen von STRUDEL²¹, ELLISON et al.²² und O'HARE²³ erwerben schon sehr frühzeitig isolierte Somiten die Fähigkeit, in Kultur Knorpel zu bilden. ELLISON et al.²² nehmen jedoch an, dass nach der Determination bis zum Auftreten charakteristischer Differenzierungsformen eine Latenzzeit besteht, in der die Umgebung die Differenzierung beeinflusst. Es ist anzunehmen, dass in dieser Zeit intensive Wechselwirkungen zwischen den Somiten und der Chorda stattfinden, da die Somitenzellen schon frühzeitig (St. 12 nach HAMBURGER und HAMILTON¹⁴) mittels zarter Filopodien unter anderem mit der Chordascheide verbunden sind. Diese Zellfortsätze sind von einem fibrillären Netzwerk sowie elektronendichtem Material in Form von «interstitial bodies» umgeben. Experimentelle Untersuchungen mit Inhibitoren und Enzymen (STRUDEL²⁴) zeigen, dass das extrazelluläre Material ein notwendiges Substrat für die vertebrale Chondrogenese darstellt.

Wenn am Ende des 3. Bebrütungstages das sekundäre Mesenchym regelmässig auch in der Abwesenheit von Neuralrohr und Chorda Knorpel bildet (WATTERSON et al.²⁵, STRUDEL²), sind die Fibrillen im perichordalen

Raum weiter ausgereift, und die Sklerotomzellen sind bereits in Richtung auf Chondrozyten differenziert.

Summary. The early differentiation of the connective tissue was investigated in the perinotochordal zone of 2-3 day-old chick embryos. After characterizing the different tissue components by transmission electron microscopy, their arrangement and distribution were examined by SEM. The results are discussed with regard to the role of the extracellular material in embryonic tissue interactions.

M. JACOB, H. J. JACOB und B. CHRIST

Lehrstuhl I des Institutes für Anatomie der Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstrasse 150, D-463 Bochum (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 30. April 1975.

²¹ G. STRUDEL, *J. Embryol. exp. Morph.* 11, 399 (1963).

²² M. L. ELLISON, E. J. AMBROSE und G. C. EASTY, *J. Embryol. exp. Morph.* 27, 331 (1969).

²³ M. J. O'HARE, *J. Embryol. exp. Morph.* 27, 229 (1972).

²⁴ G. STRUDEL, in *Extracellular Matrix Influence on Gene Expression* (Academic Press, London 1975).

²⁵ R. L. WATTERSON, I. FOWLER und B. J. FOWLER, *Am. J. Anat.* 95, 337 (1954).