

Isolationsversuche zur Analyse der Knorpelbildung aus Neuralleistenzellen bei Urodelenkeim.

Von

Eiko W. OKADA.

Zoologisches Institut, Universität zu Kioto
(Eingegangen am 31. August 1955.)

Einleitung.

Durch mehrere Extirpations- und Transplantationsversuche an Amphibienkeimen wurde festgestellt, dass die Neuralleistenzellen (Mesektoderm) die Quelle von einem grossen Teil des knorpeligen Kopfskelettes sind (Stone, '26, '29, Raven, '33, Ichikawa, '37, Hörstadius u. Sellman, '46). Bei diesen Transplantationsexperimenten zeigte aber das transplantierte Mesektodermstück, soweit es aus dem Keim bis zum späteren Neurulastadium hinauf entnommen wurde, nicht immer die Knorpelbildung. Es wurde oft hervorgehoben, dass das Stück je nach seiner Lage in dem Wirtskeim Gelingen oder Misslingen der Knorpeldifferenzierung aufweist (Ichikawa, '37, Hörstadius u. Sellman, '46, Newth, 54). Diese Tatsache deutet auf ursächliche Wirkung des umgebenden Gewebes bei Knorpelbildung des Mesektoderms hin, und dann wird die Frage naturgemäss aufgeworfen, welches Gewebe dabei wirke. Um diese Frage zu lösen, unternahm ich Isolationsversuche, über deren Ergebnisse im folgenden berichtet wird.

Herrn Prof. M. Ichikawa, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, möchte ich für seine Anregung und Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank aussprechen. Herrn T. S. Okadas wertvollen Räten verdanke ich auch die Durchführung der Arbeit.

Material und Methode.

Die Versuche wurden an Urodelenkeimen ausgeführt, und zwar hauptsächlich an *Triturus pyrrhogaster*. Daneben wurde *Hynobius nebulosus* nur selten verwendet. Die zweierlei Neuralleistestücke wurden aus der Neurula, d. h. Keime mit von eben erkennbaren bis schön erhobenen oder ein wenig sich nähernden Medullarwülsten (frühere bis spätere Neurula), entnommen. Das eine war Kopfleistenstück, das die 5-7. Regionen nach dem Plan von Hörstadius und Sellman ('46) umfasst, welche zum in Hyoid- und Kiemenbogen zu entwickelnden

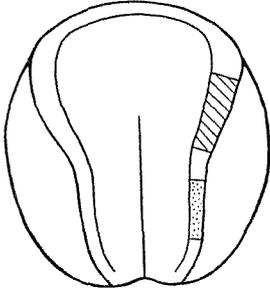


Abb 1. Urodelenneurula von dorsal; Grenzen der entnommenen Kopfleiste (gestrichelt) und Rumpfleiste (punktiert).

Material gehören, und das andere war Rumpfleistenstück, das die hinteren Regionen ausschliesslich der 8. Region umfasst (s. Abb. 1). Jedes von beiden Stücken, allein oder in der Kombination mit dem verschiedenen Material, wurde mit Bauchepidermis der Neurula umgehüllt. Als kombiniertes Material wurde dünne Wand des Vorderdarms, Mitteldarmsboden, Chordaanlage, Lateralmesoderm oder Medullarplatte des gleicharterigen Keims ausgewählt. Die so vorbereiteten Isolate wurden dann in Holtfreterlösung gezüchtet und nach 21 bis 25 Tagen fixiert.

Ergebnisse.

A. Isolationen von Kopfleiste.

(1) *Kopfleiste allein.* Von 34 Isolaten wurden 20 als blasiges, 14 als kleines geschrumpften Stück fixiert. Das erstere enthielt Chromatophoren in der bedeckenden Epidermis und Mesenchym im Innern (Abb. 2). Dagegen bestand das letztere gewöhnlich aus der atypischen Epidermis und aus wenigen Chromatophoren und wenig Mesenchym. Knorpel war keinesfalls in dieser Serie gebildet.

(2) *Mit Vorderdarmsentoderm.* In dieser Serie wurden 58 Isolate umfasst und 47 von ihnen wiesen Knorpelbildung auf (s. Tabelle). Viele Isolate bildeten geschwollene Blase manchmal mit Vorsprung, wie er an Haftfäden erinnert. Die bedeckende Epidermis war im allgemeinen dünn und mit vielen Chromatophoren übersät. Im Innern von meisten Isolaten liegt entodermale Komponente, die sich naturgemäss von dem zugefügten Vorderdarmsentoderm abgeleitet haben muss. Das Entoderm in 36 Fällen differenzierte sich zu Kiemendarm (Abb. 4), der oftmals mit Kiementaschen besetzt war, während es sich in anderen Fällen als dotterreicher Zellhaufe ohne Differenzierung zu irgendeinem bestimmten Gewebe fand. Knorpel trat in mannigfaltiger Form, Grösse und in verschiedener Anzahl auf. Es gab reichlich Mesenchym, unter welchem Kiemendarm und Knorpel eingelagert waren. Das von Mesenchym vollständig umgebene Knorpelstück war deutlich günstiger differenziert (Abb. 3 u. 4), während der sich mit dem Entoderm dicht berührende Knorpelteil gewöhnlich verzögerte Verknorpelung zeigte (Abb. 6). In drei Fällen fand man Zähne, die sich an mundartiger Einstülpung der Epidermis befanden. Daneben war neurales Gewebe oft vorhanden.

(3) *Mit Mitteldarmsentoderm.* Viele Isolate bildeten Blase mit Chromatophoren und enthielten Entodermzellen im Innern. Die Entodermzellen waren in einigen wenigen Fällen zu Kiemendarm differenziert, aber in meisten Fällen wurden

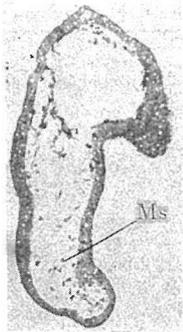


Abb. 2

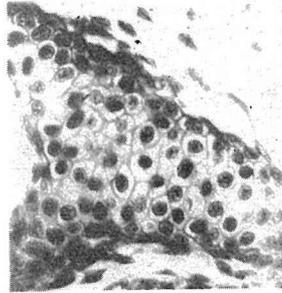


Abb. 3

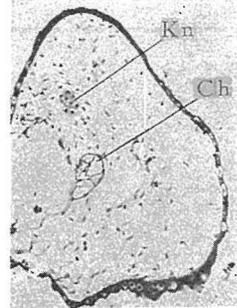


Abb. 5

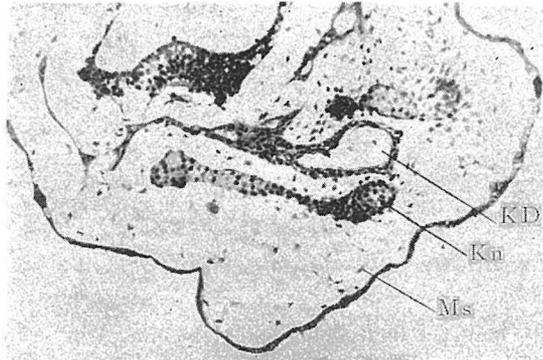


Abb. 4

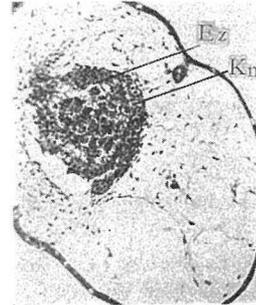


Abb. 6

- Abb. 2. Schnitt der Mesenchym (Ms) enthaltenden Blase, welche sich aus dem Isolat der Kopfleiste allein entwickelte.
- Abb. 3. Hochdifferenzierter Knorpel bei der stärkeren Vergrößerung.
- Abb. 4. Schnitt des mit Vorderdarmsentoderm kombinierten Kopfleistenisolats, worin Kiemendarm (KD) und Knorpel (Kn), von reichlich Mesenchym (Ms) umgeben, differenziert sind.
- Abb. 5. Ein kleines Knorpelstück (Kn) trat in dem mit Chorda (Ch) kombinierten Isolat auf, dessen Innere von reichlich Mesenchym erfüllt ist.
- Abb. 6. Ein sich mit dotterreichen, undifferenzierten Entodermzellen (En) berührende Knorpelstück (Kn), dessen Verknorpelung verzögert ist.

als dotterreiche, undifferenzierte Zellen gefunden. Knorpelbildung zeigte sich in drei Isolaten mit differenziertem Kiemendarm. Mesenchym wurde manchmal gefunden. In einem Fall waren Zähne gebildet.

(4) *Mit Chordaanlage.* Die aus den Isolaten entwickelten, geschwollenen Blase hatten viele Chromatophoren und waren oftmals mit hauffadenartigem Vorsprung versehen. Im Innern war Chorda vorhanden, die sich naturgemäss aus der zugefügten Chordaanlage hergeleitet haben muss. Auch Mesenchym wurde

Table 1. Übersicht über die Leistungen der isolierten Kopfleiste in den 6 Experimenten.

	Anzahl	Chromatophoren	Mesenchym		Knorpel	Zahn
			reichlich	arm		
Allein	34	29 (84%)	12 (35%)	16 (46%)	0	0
Mit Vorderdarm	58	54 (92%)	45 (77%)	8 (14%)	47 (80%)	3 (5%)
Mit Mitteldarm	31	29 (93%)	22 (70%)	6 (19%)	3 (9%)	1 (3%)
Mit Chordaanlage	52	47 (89%)	36 (68%)	8 (14%)	2 (4%)	3 (6%)
Mit Lateralmesoderm	19	18 (95%)	2 (12%)	14 (74%)	0	0
Mit Medullarplatte	30	23 (76%)	17 (56%)	10 (33%)	0	0

Da die Ergebnisse bei *Triturus* und *Hynobius* ganz übereinstimmten, so wurden sie hier zusammengefasst behandelt.

gefunden. In zwei Fällen war Knorpel gebildet, der nicht aus dem eventuell zusammen mit Chordaanlage gebrachten Material abstammend haben muss, denn er lag bei der Schnittuntersuchung in einiger Entfernung von der Chorda (Abb. 5).

(5) *Mit Lateralmesoderm.* In dieser Serie bildeten die sämtlichen Isolate stark geschwollene Blase mit Chromatophoren. Bei der Schnittuntersuchung ergab sich, dass die Isolate regelmässig aus dünner Epidermis und aus der sie unterlagernden Lamelle von Bindegewebe bestanden. Im Innern befand sich sehr grosser Hohlraum, aber Mesenchym war wenig vorhanden.

(6) *Mit Medullarplatte.* Im Innern der blasigen Isolate mit Chromatophoren waren verschiedene Kopfneuralorgane gebildet; Gehirn, Nase, Auge, Ohr u. a. Mesenchym wurde gefunden.

B. Isolationen von Rumpfleiste.

Dieselben Experimenten wurden auch bei der Rumpfleiste ausgeführt, zur Prüfung ob die Rumpfleiste, die sich nicht in der normalen Entwicklung zu Knorpel differenzieren soll (Raven, '36, Hilber, '42), unter einer gewissen experimentellen Bedingung möglicherweise Knorpel liefern könnte, d. h. ob die Rumpfleiste die Knorpelpotenz besässe.

Diese Experimenten, insgesamt 75 mal ausgeführt, hatten aber negative Ergebnisse; Knorpelbildung fand in jeder Kombination nicht statt. Die Isolate

waren als Blase oder geschrumpfte Stück fixiert. Chromatophoren und Mesenchym wurden im allgemeinen gefunden. Drei von blasigen Isolaten waren mit Schwanzflosse versehen. Die Leistungen von dem kombinierten Material deckten sich im wesentlichen mit denselben in den Experimenten der Kopfleiste.

Erörterung.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde das Kopfleistenstück von der Urodelenneurula mit dem verschiedenen Gewebe, z. B. Vorderdarms-, Mitteldarmsentoderm, Chordaanlage, Lateralmesoderm oder Medullarplatte kombiniert, und dann gezüchtet mit dem Ergebnis, dass die Knorpelbildung oft ihm gelungen war. Weil es im allgemeinen undenkbar ist, dass das hier zugefügte Material sich zu Knorpel entwickelt, so ist klar, dass der gefundene Knorpel von dem isolierten Kopfleistenstück stammten. Das Ergebnis zeigt also, dass die Kopfleiste schon in der Neurulastadium Knorpelpotenz besitzt. Dagegen konnte die Rumpfleiste bei denselben Isolationsexperimenten niemals Knorpel liefern. Die beiden Bezirke der Neuralleisten der Neurula lassen sich damit in der Differenzierungsleistung unterscheiden. Diese Feststellungen durch die Isolationsversuche bestätigen die früheren, die sich aus den Exstirpationen oder Transplantationen der Neuralleiste ergaben (Raven, '33, '35, '36, Ichikawa, '37).

Bei den vorliegenden Versuchen aber wies die Kopfleiste gute oder schlechte Leistung der Knorpelbildung je nach der Art des zugefügten Gewebe auf (s. Tabelle). Knorpel befand sich in den mit dem Vorderdarmsentoderm kombinierten Isolaten am häufigsten, nämlich 80%, und mit Mitteldarmsentoderm 9%, mit Chordaanlage 4% (s. Tabelle). In anderen Serien, soweit es sich um die vorliegenden Versuche handelt, blieb die Knorpelbildung aus. Daraus ergibt sich, dass die Kopfleiste zwar in dem Neurulastadium die Knorpelpotenz besitzt, aber noch nicht für sich Knorpel bilden kann oder nicht endgültig determiniert ist, sondern zur Knorpeldifferenzierung die Anwesenheit von bestimmtem Gewebe benötigt. Infolge unserer Resultaten muss man erstens annehmen, dass das Entoderm, besonders Vorderdarmsentoderm, bei Knorpelbildung irgendeine Rolle spielt. Auf die ursächliche Wirkung des Vorderdarms für Knorpelbildung der Neuralleiste ist schon von einigen Autoren (Hörstadius u. Sellman, '46, Woellwarth, '53, Eyal-Giladi, '54) hingewiesen worden. Bei den vorliegenden Versuchen, gab es aber einige Isolate, die mit Vorderdarmsentoderm kombiniert wurden und doch nicht Knorpelbildung zeigten. In diesen Fällen war Mesenchym wenig vorhanden. Diejenigen Isolate dagegen, in denen Knorpel gebildet wurden, enthielten stets reichlich Mesenchym, und zwar je vollständiger der Knorpel von Mesenchym umgeben wurde, desto vollkommener war die Verknorpelung. Nach diesen Befunden müssen wir annehmen, dass nicht allein Vorderdarmsentoderm, sondern auch Mesenchym für Knorpelbildung der Neuralleiste unentbehrlich ist. Dabei lässt sich aber vermuten, dass die beiden Gewebe in der verschiedenen Phase des

Knorpelbildungsvorganges wirken, denn wir haben folgende Fälle: Hochdifferenzierter Knorpel war auch noch in den zwei Fällen vorhanden, wobei das kombinierte Entoderm auf halbem Wege der Züchtung entfiel und folglich bei der Schnittuntersuchung nicht zu finden war. Im Gegenteil dazu befand sich der Knorpel, dessen Verknorpelung verzögert war, in denjenigen Fällen, worin er sich mit dem Entoderm dicht berührt und von Mesenchym nicht vollständig umschlossen war (Abb. 6). Aus diesen Tatsachen scheint es ganz begreiflich, dass das Entoderm sich auf die frühere Phase der Knorpelbildung bezieht, und das Mesenchym auf die spätere Phase derselben. Ferner führt dies uns zu den Vorstellung, dass die Neuralleistenzellen durch Kontakt mit dem Entoderm knorpelbildende Fähigkeit erwerben, aber nur unter dem weiteren Einfluss aus dem umgebenden Mesenchym die Knorpeldifferenzierung verwirklichen können. Andererseits halten wir auch es nicht für ausgeschlossen, dass Chorda für Knorpelbildung unter Umständen in derselben Beziehung wie das Entoderm steht, denn Knorpelbildung kam bei den vorliegenden Versuchen auch in zwei mit Chorda kombinierten Isolaten ohne Entoderm vor (Abb. 5), und ferner bei denselben an Anurenkeim ausgeführten Isolationsexperimenten, über welche nächstes Mal berichtet werden soll, wies ja eine ziemliche Anzahl Isolate mit Chorda Knorpelbildung auf.

Zusammenfassug.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden das Kopfleisten- und Rumpfleistenstück der Urodelenneurula, allein oder in der Kombination mit dem verschiedenen Gewebe, in Holtfreterlösung gezüchtet und seine Knorpelbildungsleistung wurde untersucht. Als kombiniertes Material wurde Vorderdarms-, Mitteldarmsentoderm, Chordaanlage, Lateralmesoderm oder Medullarplatte ausgewählt. Es bildete sich dann aus Kopfleiste häufig Knorpel, aus Rumpfleiste aber niemals. Die Knorpelbildung fand sich in denjenigen Isolaten, in denen Kiemendarm und reichlich Mesenchym enthalten waren.

Literaturverzeichnis

- Eyal-Giladi, H., '54 Arch. Biol., 65.
 Hilber, H., '42 Roux' Arch., 142.
 Hörstadius, S. u. S. Sellman, '46 Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. 4, 15.
 Ichikawa, M., '37 Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. B, 12.
 Newth, D. R., '54 J. Embryol. Exp. Morph. 2.
 Raven, Chr. P., '33 Roux' Arch., 129.
 ———, '35 Roux' Arch., 132.
 ———, '36 Roux' Arch., 134.
 Stone, I. S., '26 J. Exp. Zool., 44.
 ———, '29 Roux' Arch., 118.
 Woellwarth, C. v., '53 Roux' Arch., 146.