

Embryologisches Gutachten zu Thalidomid

von

Professor Dr. rer. nat. Dr. h. c. Beate Brand-Saberi

Lehrstuhl für Anatomie und Molekulare Embryologie

Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät

Ruhr-Universität Bochum

Universitätsstrasse 150

44801 Bochum

Tel: 0234/3224556

e-mail: Beate.Brand-Saberi@rub.de

Inhaltsverzeichnis

1	Vorbemerkung und Zielsetzung	3
2	Wirkungsweise von Thalidomid	4
2.1	Hemmung der Angiogenese durch Thalidomid	4
2.2	Wechselwirkung zwischen Blutgefäßen und Nerven	5
2.3	Induktion von oxidativem Stress durch Thalidomid	5
2.4	Bindung von Thalidomid an Cereblon	7
3	Organogenese am Beispiel der Extremitätenentwicklung	9
4	Überlappung des Phänotyps mit anderen Syndromen	12
5	Ausprägung Thalidomid-induzierter Malformationen	13
5.1	Unterschiede zwischen der linken und rechten Körperhälfte	13
5.2	Symmetrie fazialer Strukturen	17
5.3	Diskordanz bei Zwillingen	18
5.4	Auftreten einzelner Malformationen	19
5.5	Korrelation von Malformationen	20
5.6	Isolierte Nervenschädigungen	20
6	Abschließende Betrachtung	22
7	Danksagung	23
8	Literatur	24

1 Vorbemerkung und Zielsetzung

Seit dem ersten Auftreten von Malformationen bei Neugeborenen als Folge der mütterlichen Einnahme von Thalidomid während der Schwangerschaft 1957 bis 1962 und den in den nachfolgenden Jahren hierzu entstandenen wissenschaftlichen Beiträge (Lenz 1961; McBride 1961; Lenz 1962; Lenz und Knapp 1962; Somers 1962) sind in allen relevanten Teildisziplinen der biomedizinische Forschung, insbesondere aber auf dem Gebiet der Molekularbiologie bahnbrechende Fortschritte erzielt worden. Als neue interdisziplinäre Forschungsrichtung hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten die Systembiologie etabliert, von der weitere Erkenntnisse zur intrinsischen und extrinsischen Entstehung von Fehlbildungen zu erwarten sind. Der enorme wissenschaftliche Fortschritt hat sich auch in neuerer Literatur zur Wirkungsweise von Thalidomid jedoch kaum niedergeschlagen und demnach bislang noch keine systematische evidenzbasierte Berücksichtigung gefunden. Lediglich erfolgte die Erstellung eines Algorithmus zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten einer angeborenen Fehlbildung und der Einnahme von Thalidomid durch die Mutter während der sensiblen Zeitfenster in der Schwangerschaft. Dieser wird als diagnostischer Algorithmus für Thalidomid-Embryopathie (DATE) bezeichnet (Mansour et al. 2019). Neue Erkenntnisse und Konzepte zur Entstehung sichtbarer Fehlbildungen, Fehlbildungsmuster und anderer Folgeschäden durch Thalidomid machen eine Neubeurteilung bestimmter Aspekte notwendig. Dies erscheint nicht nur retrospektiv sinnvoll, sondern auch vor dem Hintergrund des fortbestehenden weltweiten Einsatzes von Thalidomid und den verwandten Pharmaka (z.B. Lenalidomid und Pomalidomid) zur Behandlung onkologischer, dermatologischer, gastrointestinaler, neurodegenerativer und infektiöser Erkrankungen (Übersicht bei Duraes et al., 2018; Richardson et al. 2002), insbesondere bei der Behandlung des *Erythema nodosum leprosum* (ENL). Die Verabreichung der Medikamente hat um die Jahrtausendwende in Brasilien zu einer erhöhten Inzidenz von Schädigungen bei Neugeborenen geführt und wird weiterhin bei Erwachsenen mit Nervenschädigungen in Zusammenhang gebracht wird (Schuler-Faccini et al. 2007; Ochinsky et al. 1994).

Im März 2022 erwähnten rund 12.250 internationale Publikationen den Begriff Thalidomid im Zusammenhang mit Embryogenese. Es gibt eine Häufung der Veröffentlichungen zu diesem Thema zwischen 2014 und 2017, die möglicherweise mit der Entdeckung der Bindung an Cereblon und dessen Wirkungsweise (Ito et al. 2010, 2011; Eichner et al. 2016) in Verbindung gebracht werden kann. Auf Cereblon wird im Abschnitt 2.4 ausführlich eingegangen wird.

Mein hier vorgelegtes Gutachten orientiert sich sowohl an aktuellen naturwissenschaftlichen Erkenntnissen als auch an klinischen Studien und soll bisher ungelöste Fragen der Medizinischen Kommission der Contergan-Stiftung beantworten oder zumindest die Diskussionsgrundlage für deren Beantwortung liefern. Eine direkte (experimentelle) kausale Aufklärung systemischer Zusammenhänge verbietet sich beim Menschen, jedoch können aus experimentellen Teilbefunden in Zell-, Organ- und Tiermodellen aussagekräftige Rückschlüsse gezogen werden. Mit meinem Gutachten möchte ich unter anderem Anregungen geben, in welche Richtung zukünftige Forschungsansätze gerichtet sein könnten.

2 Wirkungsweise von Thalidomid

Das Ausgangsmolekül („parent molecule“) Thalidomid mit einem chiralen Kohlenstoffatom im Glutarimid-Ring liegt in wässrigen Lösungen, also auch in den Körperflüssigkeiten unter physiologischen pH-Wert-Bedingungen instabil vor, so dass es ein Racemat aus zwei Enantiomeren (R- und S-) bildet, von denen das S-Enantiomer teratogen ist. Im Körper hat das Ausgangsmolekül eine Halbwertszeit von 8-12 Stunden und bildet bereits nach kurzer Zeit mehr als ein Dutzend Stoffwechselprodukte, von denen einige selbst oder in Kombination teratogen wirken (Franks et al. 2004; Lee et al. 2011). Eine tierexperimentelle Testung an Mäusen zeigt keine Teratogenität, inzwischen wurde dies auf Unterschiede im Cytochrom P450 (CYP) 3A Cluster beider Spezies zurückgeführt, der in Embryonen und in der Plazenta aktiv ist (Kazuki et al. 2016).

Im Wesentlichen sind drei nachgewiesene Wirkungsmechanismen beschrieben, die allerdings nicht separat zu betrachten sind, sondern in komplexer Weise ineinander greifen:

- 1.) Hemmung der Angiogenese durch Thalidomid
- 2.) Induktion von oxidativem Stress durch Thalidomid
- 3.) Bindung von Thalidomid an Cereblon

Weitere Erklärungsansätze existieren, lassen sich aber nicht ausreichend experimentell untermauern. So konnte aufgrund tierexperimenteller und genetischer Daten das Postulat widerlegt werden, Thalidomid sei mutagen (McBride 1994; Ashby et al. 1997; Strömland et al. 2002; Kohlhase und Holmes 2004).

Im Folgenden werden die drei genannten Mechanismen näher erläutert und durch entsprechende Literatur belegt, um sie später zu den von der Medizinischen Kommission formulierten Fragen in Beziehung zu setzen.

2.1 Hemmung der Angiogenese durch Thalidomid

Während der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren werden Prozesse der Organogenese durch ein Zusammenspiel zahlreicher Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren eng reguliert. Bei der Angiogenese gehen neue Blutgefäße aus vorhandenen hervor, wobei Endothelzellen auf lokale Stimuli hin proliferieren und gezielt auswandern (Folkman und D'Amore 1996). Dieser Prozess steht unter der Kontrolle des diffusiblen Signalmoleküls Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und dessen Tyrosin Kinase Rezeptoren (VEGFR1, VEGFR2; Gale und Yankopoulos 1999). Thalidomid und seine Metaboliten hemmen die Expression von VEGF und können auf diese Weise die Bildung neuer Blutgefäße während der Embryonalentwicklung reduzieren oder verhindern (Price et al. 2002; Ng et al. 2003). Dass dies auch für die Extremitätenanlagen gilt, konnte in mehreren Studien dokumentiert werden (Therapontos et al. 2009, Beedie et al. 2016).

Minderdurchblutung durch Fehlen von Blutgefäßen führt zu Hypoxie in den abhängigen Geweben, die wiederum zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen und den Zelltod (Apoptose) auslösen kann (siehe 2.3).

Wichtig zu erwähnen ist in Bezug auf die durch Thalidomid verursachten Neuropathien (Kapitel 5 und 6.6), dass die anti-angiogene Wirkung sowohl während der Embryonalentwicklung als auch nachgeburtlich nachgewiesen werden konnte (D'Amato et al. 1994) und demzufolge eine Beeinträchtigung der Durchblutung des perineuralen Gewebes von peripheren Nerven darstellen kann.

2.2 Wechselwirkung zwischen Blutgefäßen und Nerven

Blutgefäße und Nerven benutzen größtenteils gemeinsame „Gefäß-Nerven-Straßen“ im Bindegewebe. Diese ziehen an Kopf, Hals, Rumpf und Gliedmaßen typischerweise entlang von Weichteilrinnen, innerhalb der Körperhöhlen vom Retroperitonealraum aus zu den Organen. Während der Aussprossung der Gefäße und Nerven orientieren sich diese an permissiven und repulsiven Signalen in der Umgebung, für die die Wachstumskegel der peripheren Nerven und die Endothelzellen spezifische Rezeptoren aufweisen. Die Verfügbarkeit der Signale hängt unter anderem von der molekularen Zusammensetzung des Interzellularraums ab, da Chemokine/Cytokine unterschiedlich stark an ECM-Komponenten binden, insbesondere an Glycosaminoglykane. Sowohl bei der Entstehung neuer Gefäße oder größerer Nerven, als auch bei der Nervenregeneration, sind vielfältige Interaktionen zwischen Nerven und Gefäßen beschrieben, die zumeist über den Austausch von Mediatoren und Aktivierung von Signalkaskaden laufen, wie beispielsweise NGF, STAT3, EPHB3, und Cdc42 (Emanueli et al. 2002; Wang et al. 2017; Hobson et al. 1997). Die Entstehung von Blutgefäßen im umgebenden Bindegewebe der auswachsenden Axone wird bereits während der Embryonalentwicklung beschrieben (Taib et al. 2022) und ist weiterhin eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Funktionalität peripherer Nerven und deren Regeneration (Goda et al. 2016; Wang et al. 2017).

2.3 Induktion von oxidativem Stress durch Thalidomid

Störungen der Ontogenese und Organogenese durch oxidativen Stress sind auch für die teratogene Wirkung anderer Xenobiotika beschrieben (z.B. Phenytoin, Valproat). Die Art der Fehlbildungen unterscheidet sich jedoch typischerweise von Thalidomid, da sie bei den Antikonvulsiva in der Hauptsache Gesichtsfehlbildungen und Störungen der Entwicklung des Zentralnervensystems umfassen. Die Auslösung oxidativen Stresses in Geweben durch Thalidomid ist gut belegt (Arlen und Wells 1990; Parman et al. 1998; Hansen und Harris 2004, 2013; Hansen et al. 2002). Thalidomid wird im Körper durch die embryonale Prostaglandin H Synthase (PHS) bioaktiviert. Hierdurch kommt es zum Auftreten der Reaktiven Oxygen Spezies (ROS), die die DNA und andere zelluläre Makromoleküle schädigen kann und das Absterben von Zellen (Apoptose) herbeiführt. In Tierversuchen traten bei Kaninchen

hochsignifikant Thalidomid-typische Fehlbildungen (z.B. Dismelien) auf, die sich durch Inaktivierung freier Radikale bei identischem Versuchsaufbau vermeiden ließen. Der Wirkmechanismus von Thalidomid über oxidativen Stress kann als spezifisch ursächlich angesehen werden, da er sich durch Verabreichung von Alpha-Phenyl-N-t-Butylnitron (PBN), welches freie Radikale abfangen kann, hochsignifikant inhibieren lässt (Arlen und Wells 1996). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass Thalidomid nur in Spezies eine derartige Wirkung auf die DNA entfaltet, bei denen auch tatsächlich Fehlbildungen auftreten, die denen des Menschen ähneln. Mäuse, bei denen bekanntlich keine typischen Fehlbildungen auftreten, sind selbst bei einem Vielfachen der verabreichten Thalidomid-Dosis unempfindlich gegen DNA-Oxidation.

Neben der generellen Wirkung über eine Oxidation der DNA konnte durch andere Wissenschaftler gezeigt werden, dass Thalidomid spezifische Signalwege durch Kontrolle der Genexpression hemmt (Knobloch et al. 2007).

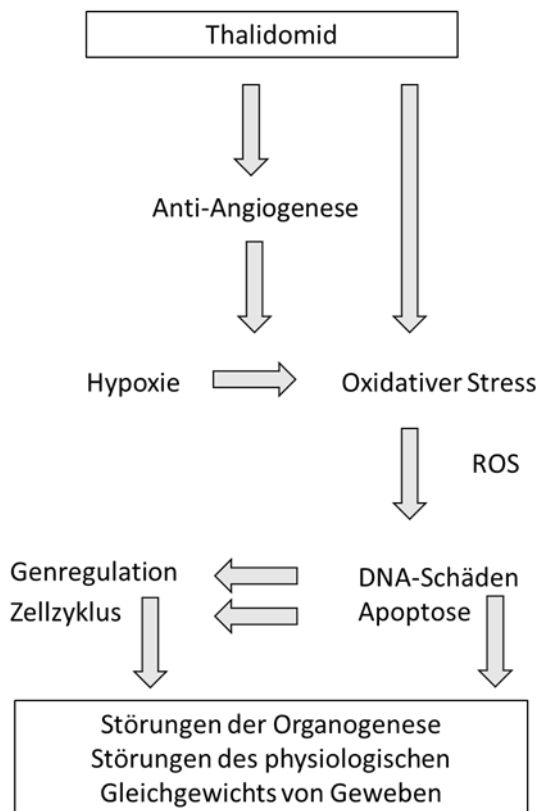


Abb. 1 Zusammenfassung der bisher beschriebenen Wirkungsweisen von Thalidomid.

2.4 Bindung von Thalidomid an Cereblon

Von einer japanischen Gruppe wurde erstmals die Bindung von Thalidomid an das Protein Cereblon beschrieben (Ito et al. 2010; Ito und Handa 2012; Ito et al. 2011). Cereblon stellt eine Untereinheit der E3-Ubiquitin-Ligase dar und interagiert mit DDB1 (DNA damage-binding protein 1) und den Cullinen (CUL4A und B). Mit diesen Proteinen bildet Cereblon eine Ringstruktur, welche in Anwesenheit von gebundenem Thalidomid sogenannte Neosubstrate binden kann, so dass diese ubiquitiniert und durch Proteasomen degradiert werden. Bei Cereblon handelt es sich um die erste Beschreibung eines direkten, funktionell bedeutsamen Bindungspartners von Thalidomid. Genetisch verändertes Cereblon kann nicht an Thalidomid binden und verursacht keine Fehlbildungen nach Gabe des Medikaments.

Wenn Cereblon durch Thalidomid gebunden ist, kann es auch seine Funktionen bei der Expressionskontrolle nicht mehr erfüllen, z.B. von FGF8 bei der Extremitätenentwicklung. Die Autoren postulieren, dass eine Ubiquitin-abhängig gestörte Proteolyse sich auf BMPs und FGF8-Signalwege in den Extremitätenanlagen auswirkt und auf diese Weise Fehlbildungen herbeiführen kann (Ito et al. 2010).

Besonders bedeutsam ist in diesem Zusammenhang der spezie-spezifische Abbau des *Spalt-like transcription factor 4* (SALL4) als Neosubstrat von Cereblon durch Ubiquitinierung, der nur in Spezie (Kaninchen, Mensch, nicht Maus) zu beobachten ist, die anfällig für Thalidomid sind (Donovan et al. 2018). SALL4-Mutationen liegen dem Okihiro-Syndrom und dem Holt-Oram-Syndrom zugrunde, die phänotypisch von typischen Ausprägungen der Thalidomid-Embryopathie nicht zu unterscheiden sind (Al-Baradi et al. 2002; Kohlhase et al. 2003; siehe Kapitel 4).

Die Degradation von SALL4 bei Bindung von Thalidomid an Cereblon im Ubiquitin-Ligase-Komplex konnte experimentell zweifelsfrei bewiesen werden und erklärt sehr viele oder sogar alle für die Thalidomid-Embryopathie spezifischen Malformationen, einschließlich der Phenokopien bekannter menschlicher Syndrome, die durch Mutationen im Gen für SALL4 verursacht werden (Kohlhase et al. 2003; Kohlhase und Holmes 2004; Koshiba-Takeuchi et al. 2006). Neben SALL4 wurden auch Isoformen ($\Delta Np63\alpha$ and $TAp63\alpha$) von p63 als Neosubstrate von Cereblon-Thalidomid identifiziert (Asatsuma-Okumura et al. 2019). p63 erfüllt wichtige Funktionen bei der Organogenese der Extremitätenanlagen und der Ohranlagen. Bereits durch die Korrelation dieser beiden Neosubstrate des E3-Ubiquitin-Ligase-Rings mit Cereblon-Thalidomid lassen sich mehrere für die Thalidomid-Embryopathie als typisch beschriebene Malformationen erklären. Zusammen mit Beobachtungen der Humangenetik bezüglich stöchiometrischer Korrelationen bei Erklärungsansätzen zur variablen Penetranz und den Erkenntnissen der Systembiologie und Biochemie bezüglich stochastischer Prozesse, liefern diese Daten auch eine wissenschaftliche Grundlage sowohl für die unilaterale Ausprägung für auf Thalidomid beruhende Malformationen und als auch deren Diskordanz bei eineiigen Zwillingen.

Weitere gesicherte Erkenntnisse zu den Abläufen bei der Teratogenese wurden 2016 von einem Münchner Forschungsteam durch die Identifizierung physiologischer Funktionen von Cereblon gewonnen, die von seiner Rolle im Ubiquitin-Ligase-Komplex unabhängig sind (Eichner et al. 2016). Cereblon erfüllt

eine Chaperon-ähnliche Funktion für die Proteine CD147 (Basigin, EMMPRIN) und MCT1. Das Zusammenwirken dieser beiden membranständigen Proteine ist entscheidend für eine Vielzahl essentieller Abläufe während der Embryogenese, zum Beispiel bei der Zellteilung, Zellmigration, beim Stoffwechsel und Überleben von Zellen sowie der Angiogenese. Sie sind außerdem besonders zahlreich in vielen verschiedenen Krebsarten vorhanden und sind deshalb ein pharmakologisch relevantes Zielprotein von immunmodulatorischen Medikamenten, zu denen auch Thalidomid gehört. Die Pharmaka konkurrieren mit Cereblon um dessen Bindungen an CD147 und MCT1, so dass diese instabil werden und ihre Funktionen nicht mehr ausüben können. Dieser Mechanismus erklärt die teratogene Wirkung von Thalidomid auf zellulärer Ebene aus meiner Sicht sehr gut und lässt sich mit vielen Beobachtungen und bisherigen Theorien in Einklang bringen. Eine systematische Analyse der Expression bzw. Proteinverteilung von CD147 und MCT1 während der Embryogenese ist bisher nicht erfolgt; eine solche wäre jedoch äußerst wünschenswert für die weitere experimentelle Aufklärung der teratogenen Wirkung von Thalidomid. Der durch Cereblon vermittelte Wirkmechanismus von Thalidomid ist vereinfacht in Abb. 2 dargestellt.

Nicht alle Patient*innen sind gleichermaßen anfällig für Nebenwirkungen von Thalidomid. Pharmakogenetische Studien der letzten Jahre haben ergeben, dass zwei genetische Varianten in Form von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) in der Promotorregion von Cereblon signifikant mit dem Auftreten von Polyneuropathien und anderen Nebenwirkungen korrelieren (Mlak et al. 2019). Außerdem wurden Polymorphismen bei Patient*innen mit Thalidomid-bedingten Malformationen identifiziert, die eine Bindung von Thalidomid an Cereblon begünstigen (Kowalski et al. 2020).

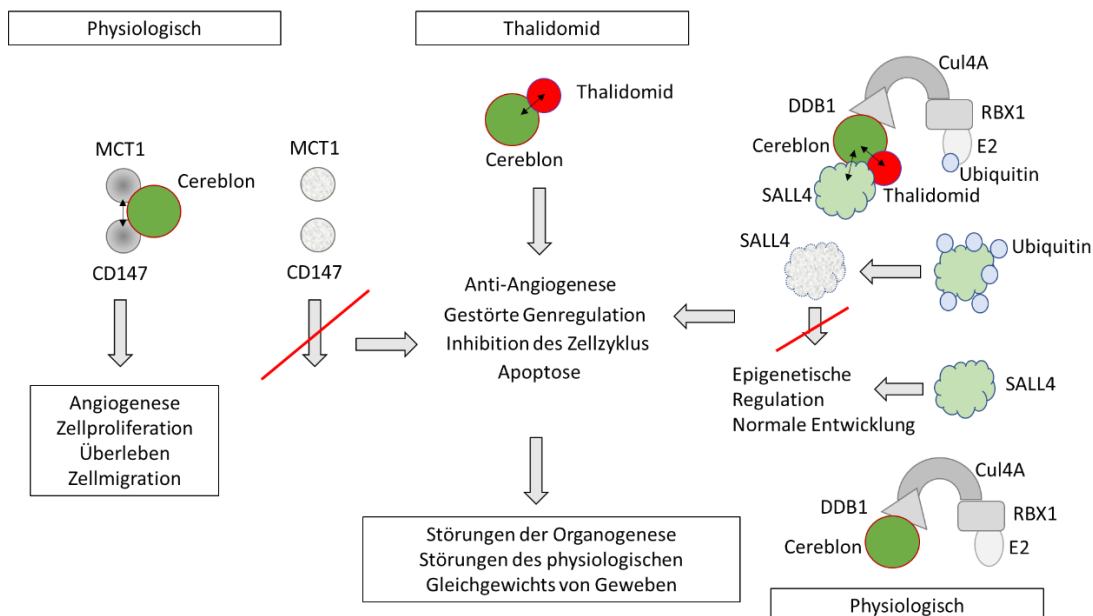


Abb. 2 Stark vereinfachtes Schema zur physiologischen Wirkung des CD147/MCT1/Cereblon-Komplexes (links) und zur Ubiquitinierung von SALL4 (rechts).

*Bei Anwesenheit von Thalidomid (rot) wird Cereblon abgefangen und kann nicht mehr seine Chaperon-ähnliche Wirkung im CD147/MCT1/Cereblon-Proteinkomplex erfüllen. CD147 und MCT1 verschwinden und können ihre Wirkung nicht mehr entfalten. Dies hat sowohl Anti-Angiogenese, Hemmung der Zellteilung, Zelltod und veränderte Genregulation zur Folge, die sich in Störungen des physiologischen Gleichgewichts und der Organentwicklung zeigen. Bei Bindung von Thalidomid an den Ubiquitin-Ligase-Komplex (rechts) wird SALL4 als Neosubstrat gebunden und nach Ubiquitinierung degradiert. SALL4 kann seine physiologischen Funktionen zur epigenetischen Kontrolle der Genregulation während der Embryogenese nicht mehr wahrnehmen. Dies hat Malformationen zur Folge, die außer für Betroffene der Thalidomid-Embryopathie auch für Patient*innen mit Holt-Oram oder Okihiro-Syndrom typisch sind.*

3 Organogenese am Beispiel der Extremitätenentwicklung

Die Organanlagen entstehen während der Embryonalperiode direkt im Anschluss an die Entstehung der Keimblätter durch die Gastrulation, d.h. zu Beginn der dritten Woche und achten Woche nach der Befruchtung. Die Entwicklungsstadien werden von mir im Folgenden anhand der Carnegie-Stadien nach Streeter benannt (Streeter 1942, 1945, 1948, 1951; Gasser et al. 2014). Hinsichtlich der Entwicklung in Tagen ab der Befruchtung (wie auch die Befruchtung selbst) ist eine Variabilität von 1 bis 3 Tagen beschrieben, die sich in den Entwicklungshorizonten von Streeter und späteren Embryolog*innen widerspiegelt (O’Rahilly und Müller 2001).

Die meisten Organe entwickeln sich durch Interaktionen zwischen Zellen aus zwei Keimblättern durch wechselseitige Induktionsprozesse. Dabei können beide Keimblätter Zellen beitragen oder nur Signale austauschen. Unter Beteiligung von Endoderm und Mesoderm entstehen die inneren Organe; außerdem ist an den enterischen Ganglien, dem Nebennierenmark und der Ausstrombahn des Herzens zusätzlich noch die Neuralleiste beteiligt. Die Extremitäten entwickeln sich durch Interaktionen zwischen Mesoderm und Ectoderm, welches schließlich nur die Haut und die peripheren Nerven beiträgt. Das ZNS und die Sinnesorgane entwickeln sich vorrangig allein aus dem Ectoderm. Die Ausdifferenzierung der Organe erfolgt organspezifisch bis zur Geburt und sogar darüber hinaus (Gehirn, Nieren, Skelett). Insbesondere während der Frühentwicklung der Organe gibt es sensible Phasen, während derer Teratogene mit besonders hoher Wahrscheinlichkeit Organschäden verursachen können. Diese Phasen sind organspezifisch und können sich überlappen, da sich insbesondere zwischen dem 20. und dem 37. Tag nach der Befruchtung (entsprechend dem 34. und 51. Tag nach Beginn der letzten Periode) mehrere Organe im kritischen Zeitfenster befinden (Nowack 1965; Kreipe 1967; Haristos 1983). Kombinationen von Schäden an mehreren Organen können deshalb resultieren, dies ist jedoch nicht zwingend der Fall (siehe unten).

Die Extremitätenentwicklung kann als Paradigma der Organogenese angesehen werden und ist sehr gut untersucht. Da die Extremitäten von Thalidomid spezifisch betroffen sind und ich mich in allen Kapiteln darauf beziehe, findet sich hier eine Übersicht über relevante molekulare Abläufe während der Entwicklung von Armen und Beinen. Die molekulare Aufklärung der Extremitätenentwicklung hat sich auch

niedergeschlagen in einer neuen Klassifikation der Fehlbildungen an den oberen Extremitäten des Menschen (Oberg et al. 2010; Tonkin et al. 2013; Lam et al. 2020), die eine evidenzbasierte Verfeinerung der bisherigen Klassifikation nach Swanson erlaubt (Swanson 1964), auf der die damaligen Einschätzungen der am häufigsten von Contergan betroffenen Organe basieren.

Die Anlagegebiete der Gliedmaßen werden durch HOX-Proteine unter Vermittlung der Signalmoleküle WNT2b (Arme) und WNT8c (Beine) entlang der cranio-caudalen Körperachse bereits vor deren Sichtbarwerden im Stadium 13 spezifiziert. Das Ausgangsmaterial der Gliedmaßen entstammt den Seitenplatten (Somatopleura) und ist durch die Aufrechterhaltung hoher mitotischer Aktivität in diesen vier umschriebenen Bezirken gegenüber den angrenzend (davor, dahinter und dazwischen) liegenden Gebieten der Flanken gekennzeichnet. Die weitere Entwicklung vollzieht sich als komplexes Wechselspiel zwischen dem mesodermalen Kern der Extremitätenknospen und ihrem Überzug aus Ektoderm, insbesondere der apikalen ektodermalen Randleiste (AER). Letztere ist für das Auswachsen der Gliedmaßenanlagen essentiell, indem sie die Quelle der Wachstumsfaktoren FGF8, später FGF4, 9 und 17 darstellt, die auf das darunter gelegene mesodermale Mesenchym, zusammen mit FGF10, als Stimulatoren der Zellproliferation wirken. FGF8 ist für das Auswachsen der Extremitätenanlagen essentiell (Lewandowski et al. 2000). Neben FGF10 im Mesenchym der Extremitätenknospe werden mehrere Bone Morphogenetic Proteine produziert. Beide Faktoren sind für die Ausbildung und Aufrechterhaltung einer funktionalen Randleiste erforderlich. Zwischen FGF10 und FGF8 besteht eine positive Signal-Rückkopplungsschleife. Die Extremitätenentwicklung benutzt also in mehreren Zusammenhängen die Kooperativität und den sogenannten „*Feed forward*“-Mechanismus (siehe Kapitel 5, Abschnitt 5.1).

Zunächst unabhängig davon wird am Hinterrand der Extremitätenknospe das Signalmolekül Sonic Hedgehog (SHH) produziert (Riddle et al. 1993). Zwischen SHH und FGFs entwickelt sich eine weitere Rückkopplungsschleife, in die außerdem BMP4 und sein Inhibitor Gremlin (GREM) eingebunden sind, die die Wirkung von SHH vermitteln.

Weiterhin greift das Protein Dickkopf als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs (über β -Catenin) durch Verstärkung des β -Catenin-Inhibitors GSK3 β in die Extremitätenentwicklung ein (Mukhopadhyay et al. 2001; Grotewold und Rütter 2002). Die Expression von Dickkopf wird durch Thalidomid verstärkt, wodurch der kanonische Wnt-Signalweg gehemmt wird. Oxidativer Stress, der wie oben erläutert durch Thalidomid verursacht werden kann, hemmt ebenfalls Wnt und Akt und reguliert BMP4 und Dickkopf hoch mit dem Ergebnis der Einleitung von Apoptosen (Knobloch et al. 2007).

Die Abschnitte der Extremitäten (Oberarm bzw. Oberschenkel, Unterarm bzw. Unterschenkel und Hand bzw. Fuß) und der Extremitätengürtel werden zunächst als knorpelige Skelettelemente angelegt. Dabei wird das Stylopodium (Humerus und Femur) zuerst spezifiziert, danach das Zeugopodium (Ulna und Radius bzw. Tibia und Fibula) und schließlich das Autopodium (Hand- und Fußknochen). An der posterioren (postaxialen, caudalen) Seite der Extremitätenanlage entstehen später die Ulna (bzw. Fibula) und der kleine Finger (bzw. die kleine Zehe), an der anterioren (präaxialen, cranialen) Seite der Radius (bzw. die Tibia) und der Daumen (bzw. die Großzehe). Die Finger und die Ulna stehen unter den Einfluss von SHH, wohingegen

der Humerus und die präaxialen Abschnitte (Radius und Daumen) der Extremität weiter von der SHH-Quelle entfernt sind und dessen Diffusion nach cranial begrenzt ist (Bénazet und Zeller 2009; Tonkin und Oberg 2013). Diese Verhältnisse können entsprechend auf die Beinanlagen übertragen werden.

Die anfangs faltenförmig abstehenden Arm- und Beinanlagen werden später an die ventrale Rumpfwand angelegt und ihre distalen Abschnitte sind als paddelförmige Hand- bzw. Fußteller abgeplattet. Durch lokale Apoptosen werden im Stadium 15 Unterarm bzw. Unterschenkel gegenüber Hand und Fuß abgegrenzt. Der Handteller ist im Stadium 16 ausgebildet. Bei Embryonen des Stadiums 17 sind am Hand- bzw. Fußteller vier radiär verlaufende Furchen zu erkennen, die den Metacarpus (Metatarsus) untergliedern und distal die Finger- bzw. Zehenanlagen gegeneinander abgrenzen. Die Randleiste bestimmt dabei die Breite des Hand- bzw. Fußtellers.

Im Inneren der Extremitätenanlage entwickeln sich fortschreitend von proximal nach distal Zonen unterschiedlicher Zelldichte. In diesen chondrogenen Zonen verdichtet sich ab dem Stadium 13 das Mesenchym durch Veränderungen in seinen Adhäsionseigenschaften schließlich ab Stadium 17 zum Vorknorpelblastem. Die hier vorhandenen Blutgefäße werden unter dem Einfluss von antiangiogenetischen Faktoren zurückgebildet und es entwickelt sich hyaliner Knorpel, der später durch Knochen ersetzt wird. Durch lokale Zelluntergänge (Apoptosen) werden die Knorpelblasteme in radio-ulnare (tibio-fibuläre) Richtung untergliedert. Das Vorknorpelblastem entwickelt sich demnach in proximo-distaler Richtung zunächst als kontinuierliche Einheit. Die Gelenkregionen entwickeln sich unter dem Einfluss von BMPs und Wnts. Dort bleibt die Knorpelbildung aus und es entwickelt sich stattdessen ein dichtes Bindegewebe, aus dem die Zusatzeinrichtungen wie Ligamente, Disci, Menisci und Synovia hervorgehen. In den hier später auftretenden Gelenkspalten werden auch Apoptosen beobachtet. Bis zur 8. Woche sind die Ellbogengelenke und Kniegelenke ausgebildet. Im Hüftgelenk findet eine Rotation statt, so dass die ehemals dorsale (Strecker-) Seite anschließend ventral liegt. Am Ende der Embryonalperiode befinden sich die Hände in Pronationsstellung, die Füße dagegen in Supinationsstellung. Die Identität der einzelnen Finger wird durch BMPs aus dem angrenzenden interdigitalen Mesenchym bestimmt, bevor dieses apoptotisch wird.

Die proximo-distale Musterbildung der Extremitäten wird durch die 5'-Gene des HoxA-Clusters und die frühe Expressionsphase (5'Hox D (1)) des HoxD-Clusters festgelegt. Distale HoxD-Gene bestimmen in einer zweiten Phase (5'Hox D (2)) auch das anterior-posteriore Muster im Autopodium und die Positionierung der ZPA. HoxD 13 erfährt dabei eine besonders komplexe Regulation, indem es in der ersten Phase postaxial, in der zweiten Phase dagegen präaxial in der Anlage des Daumens und der Großzehe exprimiert wird (Perez-Gomez et al. 2018). Heterozygote Keimbahnmutationen für HoxD13 weisen beim Menschen im Autopodium regelmäßig Seitenunterschiede auf, die nachfolgend statistisch ausgewertet werden könnten (pers. Kommunikation Dr. Martin A. Mensah, Charité). Dass Verlust oder Fehlregulation von HoxA und HoxD-Genen zu Veränderungen im Extremitätenskelett führt, wird durch Befunde bei Mäusen unterstützt, bei denen ein Funktionsverlust (Doppelknockout) von HoxD11 und HoxD13 häufig die völlige Abwesenheit der Knochen des Zeugopodiums zur Folge hat (Davis et al. 1995).

4 Überlappung des Phänotyps mit anderen Syndromen

Wie oben erläutert, verursachen Mutationen in regulatorischen Genen und die dadurch entstehenden veränderten bzw. fehlenden Proteine teilweise Malformationen, die morphologisch nicht von den durch Thalidomid verursachten zu unterscheiden sind. Dies liegt am beschriebenen Einfluss von Thalidomid auf die Expression und Funktionalität sowie die Degradation von Genen/Proteinen, die an der Organogenese beteiligt sind. Eine definitive Abgrenzung ist demnach nur auf genetischer Ebene möglich. Eine Zusammenstellung menschlicher Syndrome mit Ähnlichkeiten bzw. Überlappungen zur Thalidomid-Embryopathie finden sich bei Mansour et al. 2019 in Tabelle 2. Vor der Aufklärung des Cereblon-Thalidomid-Mechanismus der Degradierung von Neosubstraten wurden derartige Thalidomid-Malformationen als Mutationen verbucht bzw. eine Mutagenität von Thalidomid postuliert, die nachfolgend widerlegt werden konnte (Kohlhase et al. 2003; Kohlhase und Holmes 2004).

Zu den wichtigsten Syndromen mit ähnlichem Phänotyp gehören das Holt-Oram-Syndrom, welches gemeinsam mit der Thalidomid-Embryopathie einen radialen Strahlendefekt aufweist bzw. aufweisen kann. Beim Holt-Oram-Syndrom kommen als zusätzliche Merkmale häufig Reizleitungsdefekte des Herzens und Atriale Septumdefekte vor. Zur Differenzialdiagnose wird die Analyse des TBX5-Gens empfohlen. Radiusdefekte treten weiterhin beim Okihiro-Syndrom (SALL4-Mutation), beim Townes-Brocks-Syndrom (SALL1/SALL4-Mutation), TAR-Syndrom (1q2-Deletion) und der VACTERL-Sequenz (Wirbeldefekte, Analatresie, Herzfehler, Tracheo-Ösophagealfistel, Nierenfehlbildungen und Gliedmaßenfehlbildungen) auf (Mansour et al. 2019). Die Syndrome können begleitet sein (in Reihenfolge ihrer Nennung) vom kongenitalen Retraktionssyndrom nach Stilling-Türk-Duane, Analstenose bzw. -atresie, Taubheit, Nierenfehlbildungen, Thrombozytopenie, angeborenen Herzfehlern sowie Wirbelsegmentationsdefekten. Besonders erwähnenswert ist im Hinblick auf die nachfolgenden Abschnitte 5.1 und 5.2, dass die Duane-Anomalie meistens unilateral auftritt (Haus et al. 2008). Bei Phocomelie und Amelie werden ZRS-Mutationen und vorzeitige Zentromer-Separation als Differentialdiagnose vorgeschlagen. Die erst vor Kurzem beschriebenen ZRS-Mutationen (zone of polarizing activity regulatory sequences; Xu et al. 2020) betreffen den wichtigen SHH-Signalweg, der neben der antero-posterioren Musterbildung frühzeitig für die Aufrechterhaltung der Zellteilung im Mesoderm der Extremitätenanlagen erforderlich ist. Der SHH-Signalweg ist, wie in Kapitel 3 erläutert, für die Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse (Daumen-Kleinfinger) der Gliedmaßen ausgehend von der Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) ausschlaggebend. Bei Mutationen in diesem Signalweg ist SHH auch anterior exprimiert und führt zu präaxialer Polydaktylie (Xu et al. 2020). Ektopische Expression von SHH kann außerdem durch Mutationen von Twist beim Saethre-Chatzen-Syndrom des Menschen (el Ghouzzi et al. 1997; Howard et al. 1997; Gripp et al. 2000; Cai et al. 2003; Jabs 2004) und genetisch veränderten Mäusen (Bourgeois et al. 1998; Firulli und Conway 2008) beobachtet werden. Twist interagiert dabei mit dHAND (HAND2; Charité et al. 2000), welches auf diese Weise ebenfalls die Regulation von SHH beeinflusst. Diese und andere Regulatoren der Extremitätenentwicklung werden bei Mansour et al. 2019 nicht berücksichtigt,

erscheinen jedoch angesichts der komplexen Regulation bei der Entwicklung des distalen Extremitätenabschnitts durchaus zur Abgrenzung genetischer von exogenen Ursachen der Teratogenese wichtig. Insbesondere, da die Autoren für die Erstellung des DATE verantwortlich zeichnen.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass eine variable Penetranz nicht nur für ZRS, sondern auch beim Vorliegen von Haploinsuffizienz für Twist 1 und HOXD13 beobachtet wird (Zug 2022; persönliche Kommunikation Mensah und Füchtbauer 2022). Variable Penetranz von Genmutationen hat häufig unilaterale Fehlbildungen zur Folge.

Im Zuge der Identifizierung weiterer Neosubstrate von Cereblon-gebundenem Thalidomid im E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex könnten in Zukunft weitere Fehlbildungsmuster auf Thalidomid zurückführbar sein, weshalb hierzu eine Intensivierung der Forschungsbemühungen wünschenswert ist.

Im folgenden Kapitel 5 sollen einzelne Fragen der Medizinischen Kommission der Contergan-Stiftung thematisiert werden.

5 Ausprägung Thalidomid-induzierter Malformationen

5.1 Unterschiede zwischen der linken und rechten Körperhälfte

„Entwickeln sich die Körperhälften des Embryos unterschiedlich schnell und bis zu welchem Grad können somit durch Thalidomid verursachte orthopädische Schädigungen links und rechts in unterschiedlicher Schwere bzw. nur einseitig auftreten?“

Das einseitige Auftreten von Fehlbildungen bei Neugeborenen und Labortieren ist ein allgemein bekanntes, wenn auch bislang ungeklärtes Phänomen (Füchtbauer, Mensah, persönliche Kommunikation). Für einzelne menschliche Syndrome manifestiert sich ihr Auftreten sogar stets nur einseitig, wie z.B. beim Poland-Syndrom. Seitenunterschiede werden sowohl bei genetisch verursachten systemischen Entwicklungsstörungen (Keimbahn-Mutationen) als auch bei Fehlbildungen unklarer Genese und somatischen Mosaiken regelmäßig beobachtet, aber bisher kaum statistisch erfasst. Seitenunterschiede bei Fehlbildungen können demnach intrinsische als auch extrinsische Ursachen haben und wurden bereits in den 1960er Jahren im Zusammenhang mit der Thalidomid-Embryopathie beschrieben (Smithells 1962; Lenz und Knapp 1962). Auf den beiden Körperseiten unterschiedlich stark ausgeprägte Fehlbildungen sollen zwischen 16% und 23% der Fehlbildungen ausmachen (McCredie 2007). Insgesamt sind die oberen Extremitäten am häufigsten von Fehlbildungen betroffen; sie treten dort signifikant häufiger auf und sind etwas öfter asymmetrisch als an den unteren Gliedmaßen (McCredie 2007; Lenz und Knapp 1962; UK Government Report 1964; Nowack 1965; Schmidt und Salzano 1980; Schmidt und Salzano 1983; Vargesson et al. 2015). In diesen Quellen finden sich auch Belege für seltene Fälle, in denen eine Amelie einseitig auftritt und

die Gliedmaße der kontralateralen Seite nur distal Auffälligkeiten aufweist (z.B. Fall 5 in McCredie 2007, S. 75-76). Dies scheint insbesondere für Malformationen der Augen sogar der Regelfall zu sein (Smithells 1973). Je geringer die Seitenunterschiede sind, desto häufiger werden sie beobachtet. In der Schweresequenz der Ausprägung der Malformationen treten in leichten Fällen Veränderungen des Daumens auf, danach ist der Radius betroffen, nachfolgend der Humerus. Erst bei schweren Ausprägungen ist die postaxiale Seite der Extremitäten im Autopodium und zuletzt im Zeugopodium betroffen. Auch bei anderen Malformationen der Extremitäten sind präaxiale Strukturen signifikant häufiger betroffen als postaxiale. Der Unterschied zwischen präaxial und postaxial erscheint mir erklärbar durch die komplexere Regulation des präaxialen Abschnitts während der Extremitätenentwicklung, die insbesondere den Daumen betrifft.

Aus Sicht von Terracini (2021) gibt es keinen wissenschaftlichen Grund, Malformationen mit unterschiedlicher Ausprägung auf den Körperseiten von der Möglichkeit auszuschließen, durch Thalidomid verursacht worden zu sein und schätzt den Anteil einseitiger Armfehlbildungen an den Thalidomid-Embryopathien auf 5,2%. Der Ausschluss von rechts und links stark unterschiedlich ausgeprägten Malformationen paariger Organe von einer Thalidomid-Embryopathie, insbesondere von unilateral auftretenden, ist als derzeit empfohlene Vorgehensweise bei Verwendung des diagnostischen Algorithmus DATE auch aus meiner Sicht und den obigen Ausführungen äußerst problematisch (Mansour et al. 2019). Terracini deckt in seinem bemerkenswerten Artikel auf, dass das Ausschließen von Betroffenen mit Seitenunterschieden der Fehlbildungen einen frühen systematischen Fehler darstellt, der aus unvollständiger Dokumentation resultiert und unkritisch in einem Teil der Fachliteratur immer weiter tradiert wurde. Genaue statistische Untersuchungen scheinen zu fehlen. Nicht selten finden sich widersprüchliche Aussagen in Bezug auf die beidseitige Betroffenheit paariger Organe sogar innerhalb desselben Artikels (Smithells und Newman 1992).

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass trotz der äußeren Symmetrie des menschlichen Körpers die beiden Körperhälften in der Frühentwicklung unterschiedlichen Signalprozessen ausgesetzt sind, die auch für die Seitenunterschiede vieler innerer Organe (Herz und große Gefäße, Milz, Gastrointestinaltrakt) verantwortlich gemacht werden. Die zweischichtige Keimscheibe wird während der Gastrulation zur dreiblättrigen Keimscheibe umgeformt. Dies geschieht entlang der Primitivrinne, die cranial in dem Primitivknoten ausläuft. Bei Wirbeltieren einschließlich Mammalia wird eine Asymmetrie der Zellen des Primitivknotens und eine Zilienbewegung an Zellen des Primitivknotens beschrieben, die Signalmoleküle in eine Richtung dirigiert. Die TGF- β ähnlichen Signalmoleküle Nodal und Lefty werden einseitig in der linken entstehenden Seitenplatte exprimiert (Müller et al. 2012; Wang et al. 2016). In den nachfolgenden Entwicklungsstadien wird linksseitig der Transkriptionsfaktor Pitx2 exprimiert. Pitx2 ist für die Seitenspezifität der inneren Organe erforderlich (Piedra et al. 1998; Shiratori et al. 2006). Es wird angenommen, dass diese Mechanismen auch beim Menschen eine Rolle spielen, denn bei Ziliopathien wie dem Kartagener-Syndrom ist das Auftreten von Heterotaxien und *Situs inversus* deutlich erhöht. Die Seitenspezifität prägt sich jedoch normalerweise nicht im Bewegungsapparat aus.

Am ehesten zu erklären ist das Phänomen der unterschiedlich starken Ausprägung von äußeren Fehlbildungen durch die **Selbstorganisation** von Organanlagen (Newman und Forgacs 2005). Die Extremitätenanlage ist dafür ein klassisches Beispiel, welches von theoretischen Modellen adressiert wird (Wolpert 1969; Gierer und Meinhardt 1972). Hinsichtlich der Beteiligung bestimmter Kategorien von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren, wie auch durch die ablaufenden Prozesse kann die Extremitätenentwicklung als modellhaft für die Entstehung vieler anderer Organanlagen angesehen werden. Auf diese Weise sind die für die Thalidomid-Embryopathie beschriebenen craniofacialen, cardialen, gastrointestinalen und renalen Fehlbildungen über dieselben Wirkmechanismen erklärbar.

Unter **Selbstorganisation** ist in diesem Zusammenhang zu verstehen, dass Organe an einer bestimmten Stelle als sogenanntes **morphogenetisches Feld** angelegt werden, die nachfolgende Entwicklung sich jedoch durch Prozesse vollzieht, die unabhängig vom Restorganismus (also auch von der kontralateralen Seite) innerhalb dieses morphogenetischen Feldes, unter dem Einfluss der darin entstehenden Signalabläufe stattfinden. Dies ist nach der Spezifizierung eines morphogenetischen Feldes wie z.B. dem Extremitätenfeld oder der Ohrplakode sogar isoliert vom Restorganismus möglich, solange die entsprechende Blutversorgung oder eine Versorgung mit Nährstoffen *in vitro* gewährleistet ist (Brand et al. 1985; Hardy et al. 1995; Torres und Giraldez 1998; Britton et al. 2019). Komplette oder „angeleitete“ Selbstorganisation wird in sogenannten „dissipativen Strukturen“ beobachtet, zu denen lebende Systeme gehören (Prigogine et al. 1969; Goldbeter 2018; Serrano Morales et al. 2021). Als dissipativ werden diese Strukturen deshalb bezeichnet, weil sie zu keinem thermodynamischen Gleichgewicht streben, sondern unter Verbrauch von Energie aufrechterhalten werden.

Zu den wichtigsten Hypothesen der Selbstorganisation gehören die theoretischen Modelle zur Entstehung von Mustern, die auf den Ansatz von Alan Turing zurückgehen (Turing 1952; Gierer und Meinhardt 1972; Schnakenberg 1979). Diese Modelle basieren auf der Diffusion chemischer Substanzen zwischen Zellen und Geweben, die infolge von chemischen Reaktionen lokale Instabilität entstehen lassen (Reaktion-Diffusion) und so periodische repetitive Muster erzeugen (Kondo und Miura 2010; Sharpe und Green 2015). Diese Modelle gehen von Morphogenen aus, d.h. von diffusiblen Signalen, die den Zellen im Gewebe, in Anhängigkeit ihrer Konzentration, eine bestimmte Positionsinformation vermitteln. Angewendet auf die Extremitätenentwicklung beschreibt Wolpert dies mit dem „*French-Flag*“-Modell, bei dem der Morphogengradient am Hinterrand der Extremitätenknospe hoch ist und nach anterior abfällt. Zellen erkennen diesen Morphogengradienten und erhalten anhand eines Schwellenwerts eine zugewiesene Positionsinformation, aus der ein räumliches Muster entsteht (Miura 2013). Mit diesem Modell kann die Wirkung der ZPA im physiologischen und experimentellen Szenario erklärt werden. Selbst wenn Morphogene wie SHH selbst nicht weit genug diffundieren, ist vorstellbar, dass ein solcher Gradient über Relais-Mechanismen aufgebaut werden kann (Bénazet und Zeller 2009). In neuerer Zeit kam die Betrachtung mechano-physikalischer Einflüsse hinzu (Mercker et al. 2016; Shyer et al. 2017; Recho et al. 2019), die die Gewebeeigenschaften und die Größe der Organanlage in die Betrachtungen einbezieht. In sich entwickelnden Organismen spielen darüber hinaus

auch sich dynamisch verändernde Adhäsionseigenschaften sowie das Wachstum eine entscheidende Rolle (Tallinen et al. 2016).

In diesem Zusammenhang spielt auch die Bindung von Cereblon an Thalidomid eine Rolle (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.3), da das Neosubstrat dieser Verbindung CD147 an der Zelladhäsion bei Entwicklungsvorgängen beteiligt ist.

Durch die oben erwähnten Modelle können in der Embryologie bzw. Entwicklungsbiologie stochastische Prozesse wie lokale Oszillationen berücksichtigt werden (Hess und Boiteux 1971; Goldbeter et al. 1990; Venzin und Oates 2020). Solche Oszillationen können sich in zyklisch wiederkehrenden Abläufen und Mustern, wie z.B. dem Zellzyklus, circadianen Rhythmen oder zeitlich-räumlichen Mustern manifestieren und funktionieren typischerweise, indem sie die oben bereits angesprochenen Schwellenwerte nutzen. Werden diese nur geringfügig unter- bzw. überschritten, so hat dies unterschiedliche Konsequenzen auf zellulärer Ebene.

Aus den obigen Ausführungen wird deutlich, dass Abläufe, die ganz oder partiell von stochastischen Prozessen beeinflusst werden, als Entscheidungsprozesse einer jeden Zelle betrachtet werden müssen, die zwar zu Interaktionen mit anderen Zellen im Zellverband (Gewebe) befähigt ist, jedoch letztlich ihre Entscheidungen zu ihrem komplexen Verhaltensspektrum individuell fällt (Samoilov und Vasilev 2009; Isaeva 2012). Dies zeigt sich besonders deutlich bei Störungen des physiologischen Ablaufs. Die Systembiologie versucht, die Komplexität von Organismen durch geeignete mathematische Modelle auf der Grundlage von Experimenten und Datenanalysen vorauszusagen und dadurch neue Erkenntnisse zu gewinnen um biologische Phänomene zu erklären und besser zu verstehen. Dabei spielt der Begriff der Bistabilität eine wesentliche Rolle, die auch über die Entstehung von Krankheiten und Fehlbildungen entscheidet. Entwicklungsstörungen durch Verlust der Bistabilität, die in lebenden Systemen als das Vorhandensein zweier stabiler Zustände und eines instabilen definiert wird, ist auf regulatorische Netzwerke, positives Feedback und Kooperativität angewiesen. Verlust einer dieser Komponenten führt zur Störung des physiologischen Ablaufs. Dies manifestiert sich auch in der medizinischen Genetik bei Vorliegen inkompletter Penetranz und variabler Expressivität (Zug 2022).

Zellen in komplexen Organismen teilen sich nicht synchron, sondern in jeder Zelle wird der Fortgang des Zellzyklus durch sogenannte Checkpoints (Kontrollstellen) daraufhin überprüft, ob alle inneren und äußeren Voraussetzungen für den Übergang in die nachfolgende Phase gegeben sind. Deshalb wachsen auch nicht beide Seiten des Embryos vollständig synchron, sondern nur in der Summe aller Zellen ungefähr synchron. Zellen teilen sich insbesondere dann asynchron, wenn sie mit ungünstigen Bedingungen konfrontiert werden, zu denen auch toxische Substanzen zählen. Die Zelle verfügt über eine Reihe von Reparaturmechanismen und Optionen, eine Schädigung auszugleichen, aber diese sind begrenzt und verlangsamen das embryonale Wachstum. Dadurch können auch Signalkaskaden beeinflusst werden und nachgeordnete Prozesse im ungünstigsten Fall ausbleiben. Sogar bei systemisch genetisch veränderten Wirbeltieren oder bei nachgewiesenen Erbgutveränderungen des Menschen versuchen die Zellen, das in allen Zellen gleichermaßen auftretende Fehlen des Proteins zu kompensieren, um auf diese

Weise trotzdem eine normale Entwicklung zu durchlaufen. Dies gelingt jedoch immer nur lokal und ist deshalb einer hohen Variabilität unterworfen, die sich z.B. durch variable Penetranz zeigt (Zug 2022). Bei der Verabreichung exogener Noxen wie Thalidomid spielen zusätzlich noch weitere Faktoren wie Zeitpunkt und Dauer der Einnahme und Mikro-Verteilung im Embryo eine Rolle. Selbst minimale Unterschiede im Ablauf des Zellzyklus und der Diffusion von Botenstoffen können sich potenzieren. Das einseitige Auftreten von Fehlbildungen ist also möglich, sobald mehrere voneinander abhängige Faktoren oder Vorgänge aufeinandertreffen. Da dies statistisch sehr selten ist, kommen diese einseitigen Störungen in extremer Ausprägung (eine Seite ist nicht betroffen, die andere stark betroffen) auch nur selten vor, sind jedoch für die Thalidomid-Embryopathie belegt (McCredie 2007, Tabelle 7.1). Seitenunterschiede geringeren Ausmaßes werden allerdings regelmäßig bei menschlichen und tierischen Fehlbildungen beobachtet. Dies ist auch für die Thalidomid-Embryopathie statistisch belegbar (siehe oben) und unterstreicht dadurch die Plausibilität meiner obigen Argumentation und die heutige Sichtweise.

5.2 Symmetrie fazialer Strukturen

„Verläuft die Entwicklung fazialer Ausprägungen, hier im Hinblick auf mögliche Minder- oder andere Fehlbildungen im Bereich von Ohrmuscheln, Innenohrstrukturen und Augen bzw. fazialer Nerven, ähnlich symmetrisch wie die der Extremitäten?“

Grundsätzlich verläuft die Entwicklung etwa ab der vierten Woche nach der Befruchtung auf beiden Körperseiten gleich, jedoch gelten die vorangehenden Aussagen zu stochastischen Prozessen auch hier. Hinzu kommt beim Ohr allerdings die Tatsache, dass das äußere Ohr morphologisch sehr stark variiert (Krishan et al. 2019) und dass die Ohrmuscheln derselben Person bei einem relativ hohen Prozentsatz untersuchter Individuen rechts und links unterschiedlich gestaltet sind und mit Fehlbildungen des Innenohrs einhergehen kann (Rani et al. 2021). Dieser Sachverhalt legt nahe, dass bei der Entwicklung des Ohres ein hoher Grad an Variabilität in den Entwicklungsabläufen zugrunde liegen muss. Dies scheint mir zumindest für die Ohrmuschel nachvollziehbar, da sie aus mehreren, anfangs separaten Anteilen (Ohrhöckerchen) entsteht. Liegen Fehlbildungen des äußeren und inneren Ohres und der angrenzenden knöchernen Strukturen vor, hat dies Variationen im Verlauf des N. facialis in diesem Bereich zur Folge. Zu Seitenunterschieden zwischen den Ohrfehlbildungen von Thalidomid-Patient*innen gibt es widersprüchliche Angaben (Smithells und Newman 1992). Miller und Strömmland berichten von unilateralen und bilateralen Fehlbildungen der Ohren, geben hierzu jedoch keine Zahlen an (Miller und Strömmland 1999).

Sowohl in den Extremitäten als auch im craniofacialen Gebiet verlaufen weder die Nerven noch die Blutgefäße ganz symmetrisch. Varianten sind in allen Lehrbüchern der Anatomie beschrieben. Bei Vorliegen von Fehlbildungen im knöchernen Skelett oder Muskelvarianten kommt es zu aberranten Gefäß- und Nervenverläufen, die sich auch wiederum gegenseitig bedingen können. Das Phänomen der paradoxen Tränenbildung (Ramsey und Taylor 1980) wird auf Fazialisparese und Fehlinnervation

zurückgeführt und neben anderen Auffälligkeiten an den Augen regelmäßig unilateral beobachtet (Miller und Strömmland 2011, Tabelle 3).

Bei Funktionsverlust von SALL4, sei es durch Mutationen oder durch Ubiquitinierung in Anwesenheit von Thalidomid, kommt es ebenso wie beim Okihiro-Syndrom (OMIM 607323; „DR“-Syndrom nach Temtamy et al. 1975) unter anderem zu (unilateraler oder bilateraler) Taubheit und Asymmetrien des Gesichts (Kohlhase et al. 2003). SALL4 ist für die Aufrechterhaltung der Zellteilung embryonaler Stammzellen verantwortlich und kooperiert mit SALL1 bei der regelrechten Entwicklung des Herzens, der Nieren, des Gehirns und des Darmkanals (Sakaki-Yumoto et al. 2006).

Fehlbildungen des Innenohrs können auf die Degradierung von p63 durch Ubiquitinierung zurückzuführen sein, da p63 neben SALL4 zu den identifizierten Neosubstraten des Cereblon-Ubiquitin-Ligase Komplexes gehört. Für bestimmte Isoformen von p63 sind beim Zebrafisch Defekte im Innenohr (und Extremitäten-defekte) beschrieben worden (Asatsuma-Okumura et al. 2019).

Ebenso ist das oben erläuterte Neosubstrat von Cereblon-Thalidomid, CD147, für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion der Fotorezeptoren in der Retina notwendig (Hori et al. 2000). Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von CD147 an der Augenentwicklung bei *Drosophila* (Curtin et al. 2005) und an kultivierten Säugerzellen (Deora et al. 2004).

5.3 Diskordanz bei Zwillingen

„Verläuft die embryologische Entwicklung von Zwillingen stets vollkommen synchron bzw. welche relevanten Punkte bezüglich der embryologischen Entwicklung sind zu beachten (eineiig, zweieiig, Chorion und Plazenta getrennt oder verschmolzen, ...), die z. B. erklären helfen, aus welchem Grund mitunter nur ein Zwilling überhaupt betroffen ist oder beide Zwillinge unterschiedlich ausgeprägte Fehlbildungen aufweisen?“

Obwohl monozygotische Zwillinge häufiger hinsichtlich Fehlbildungen konkordant sind als dizygotische, ist Diskordanz für monozygotische Zwillinge mehrfach beschrieben worden (Fogel et al. 1965). Außerdem weisen Letztere insgesamt Fehlbildungen statistisch häufiger als dizygotische Zwillinge auf. Handelt es sich um dizygotische Zwillinge, kann die Anfälligkeit der beiden aufgrund der beschriebenen bzw. noch nicht erkannter Genvarianten für Thalidomid unterschiedlich sein. Bei monochorialen Zwillingen können sowohl fusionierte Plazenten als auch gemeinsame Plazenten vorliegen. Bei Letzteren sind die Anteile in der Regel nicht genau unterscheidbar.

Diskordantes Auftreten von Thalidomid-Malformationen wurden sowohl für zweieiige (dizygotische) als auch für eineiige (monozygotische) Zwillinge beschrieben (Schmidt und Salzano 1980; McCredie 2007, S.369 Fig. 29.1). Im ersten Fall unterscheidet sich die genetische Prädisposition der Zwillinge, im zweiten Fall ist zwar die genetische Ausstattung (Sequenz) identisch, es könnten jedoch

epigenetische Unterschiede auftreten, ähnlich wie auch auf den beiden Körperseiten desselben Individuums. Epigenetische Unterschiede zeigen sich in der Genaktivität (Genexpression). Solche Unterschiede werden durch Umgebungsfaktoren auf lokaler (zellulärer) Ebene bestimmt. Heute werden durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) über die Analyse der SNPs Haplotypen identifiziert, die mit dem Auftreten von Phänotypen (wie auch Malformationen) gekoppelt sind und damit eine Anfälligkeit für bestimmte teratogene Wirkstoffe voraussagen können (Edwards et al. 2013). Bei den SNPs handelt es sich in 80% der Fälle um die nicht-kodierenden Bereiche der Gene, z.B. die regulatorischen Abschnitte. Verschiedene Haplotypen können eine Diskordanz bei dizygotischen Zwillingen leicht erklären, liefern aber auch Anhaltspunkte für Seitenunterschiede und diskordante eineiige Zwillinge, da die SNPs zu über 80% genregulatorische Bereiche betreffen. Somit ist die Genaktivität in diesen Fällen von stochastischen Prozessen geprägt und kann somit variieren (s.o.).

Unabhängig von Thalidomid beschreiben Fogel und Kollegen (Fogel et al. 1965) Diskordanz bezüglich Malformationen bei 5 von 24 untersuchten eineiigen Zwillingspaaren. Im selben Zeitraum wurden unter 79 dizygotischen Zwillingspaaren keine konkordanten Fehlbildungen und nur in einem Fall diskordante gefunden.

Es kann unter Umständen davon ausgegangen werden, dass nicht alle in der Literatur beschriebenen Zwillingspaare zweifelfrei und korrekt als mono- oder dizygotisch klassifiziert wurden. Soweit keine eindeutige Klassifikation anhand der Amnionverhältnisse möglich ist, müsste eine genetische Analyse beider Zwillinge erfolgen.

Hinsichtlich der Durchströmung beider Plazenten bzw. der gemeinsamen Plazenta mit mütterlichem Blut könnten auch folgende Überlegungen zum sogenannten Zwilling-Transfusionssyndrom von Bedeutung sein:

Das Zwilling-Transfusionssyndrom betrifft etwa 10% der monochorialen Zwillingsschwangerschaften; diese können monozygotisch oder dizygotisch sein. Durch Verbindungen zwischen den Blutgefäßen kann es zu einer Imbalance in der Blutversorgung beider Zwillinge kommen. Der Blutstrom wird vom sogenannten Donator zum Akzeptor weitergeleitet (Ulfig und Brand-Saberi 2017) und führt zu ungleichen Wachstumsverhältnissen der beiden. Der Donator bleibt im Wachstum zurück. Auf diese Weise könnten im mütterlichen Blut enthaltene Medikamente möglicherweise bereits teilweise verstoffwechselt worden sein, wenn sie beim zweiten Zwilling ankommen oder unterschiedlich lange im Blutstrom eines jeden der Zwillinge verbleiben. Auf diese Weise könnte die Medikamentengabe mit sensiblen Phasen des einen, aber nicht des anderen Zwillinges überlappen.

5.4 Auftreten einzelner Malformationen in Abhängigkeit vom Einnahmezeitpunkt

„Vor dem Hintergrund der in der Anlage beigefügten Synopsis vom Zeitpunkt der Thalidomideinnahme: Ist es denkbar, dass bei Einnahme des Medikaments am Tag x nur eine oder keine der hier aufgeführten Schädigungen eintritt oder ist durch die

zeitliche Parallelität der embryonalen Entwicklung die Einwirkung der Noxe auf den Fötus in etwa gleich verteilt?“

Vor dem Hintergrund meiner obigen Ausführungen (insbesondere Abschnitte 5.1 und 5.2) sehe ich es im Bereich des Möglichen, dass an einzelnen Organen, die gemeinsame oder überlappende sensible Phasen aufweisen, gar keine oder eine isolierte Schädigung einseitig auftritt: Zellen kompensieren Schädigungen zunächst als Individuen, nicht als Verband (Gewebe) oder gar als System (Organismus). Wenn schon einseitige Fehlbildungen desselben Organs möglich sind, ist eine Affektion unterschiedlicher Organsysteme ebenfalls nicht automatisch zu erwarten, sondern hängt von mehreren zusätzlichen Parametern ab, deren Zusammentreffen erst die Fehlbildung im zweiten oder dritten System zur Folge haben.

5.5 Korrelation von Malformationen in Abhängigkeit vom Einnahmezeitpunkt

„Ist es aufgrund der embryologischen Entwicklung somit zwingend, dass Schädigungen durch Thalidomid bei Einnahme des Medikaments in einem festgelegten Zeitraum korrelieren, beispielsweise Ohrschädigungen mit Daumenschädigungen?“

Auch diese Variante ist möglich, aber Fehlbildungen mit überlappenden sensiblen Phasen sind nicht zwingend miteinander gekoppelt. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass frühe sensible Phasen (z. B. Ohrmuschel und Arme), mittlere (z.B. Humerus und Duodenum) und spätere sensible Phasen (z.B. Gallenblase und Genitale) bei Einnahme des Medikamentes über einen kurzen Zeitraum von einem bis wenigen Tagen, eher zu Korrelationen zwischen den genannten Organanlagen führen als zeitlich weit auseinanderliegende sensible Phasen und die zugehörigen Organe (z.B. Ohrmuschel und Thenare Triphalangie).

5.6 Isolierte Nervenschädigungen

„Ist auch eine thalidomidbedingte Schädigung von Nerven losgelöst von der Schädigung damit verbundener Strukturen denkbar, beispielsweise die Schädigung des Nervus medianus ohne orthopädische Schädigung von Unterarm bzw. Hand?“

Durch Chemotherapeutika, einschließlich Thalidomid, kann bei erwachsenen Patient*innen, unabhängig von einer vorausgehenden pränatalen Schädigung durch Thalidomid, eine Schmerzüberempfindlichkeit (Allodynie) in peripheren Nerven verursacht werden (Chaudry et al. 2002). Innerhalb der ersten Neurone der somatosensorischen Bahnen, die in den Spinalganglien liegen, exprimieren Untergruppen die Rezeptoren Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), TRP vanilloid 4 (TRPV4) und TRPV1 (De Logu et al. 2020; Mori et al. 2016). Diese verschiedenen Rezeptoren vermitteln in unterschiedlichem Ausmaß Schmerzempfindlichkeit gegenüber Kälte, mechanischen Einflüssen und oxidativem

Stress. Sie sind Untersuchungen an Nagetieren zufolge für Allodynie verantwortlich, die durch Gaben von Thalidomid ausgelöst werden kann (De Logu et al. 2020; Mori et al. 2016).

Das Einwachsen der motorischen und somatosensorischen Nervenfasern erfolgt während der Entwicklung in Form von Faszikeln im Stadium 16 bis 17 nach Carnegie (ca. 37. bis 41. Entwicklungstag), also nachdem sich die Extremitätenanlagen als Ausstülpungen der Somatopleura gebildet haben (Tonkin und Oberg 2013). Während der Normalentwicklung wandern zunächst die Muskelvorläuferzellen in das Extremitätenmesenchym ein, erst danach folgen die peripheren Nerven. Bei der Plexusbildung und Versammlung an der Extremitätenbasis orientieren sich die Nerven an Signalen aus den Extremitätenanlagen, wie experimentell gezeigt werden konnte (Turney et al. 2003).

Während die Ursprungszellen der motorischen Anteile der peripheren Nerven im Vorderhorn des Rückenmarks liegen und ihre Axone über die ventrale Wurzel zu ihren Zielmuskeln aussprossen, entstammen die Fortsätze der allgemein somatosensorischen Anteile den Spinalganglien und sind somit Derivate der Neuralleiste. Außerdem handelt es sich bei ihnen im Gegensatz zu den motorischen Anteilen um dendritische Fortsätze, die im Zuge der Differenzierung der Spinalganglienzellen zu pseudounipolaren Ganglienzellen im Anfangsteil mit den zentripetal gerichteten neuritischen Axonen zusammenlaufen. Ebenfalls der Neuralleiste entstammen die Gliazellen des gesamten peripheren Nervensystems (Schwannzellen), einschließlich der Hirnnerven. Während der Entwicklung wandern die Zellen der Neuralleiste, wie die Zellen der sensorischen Plakoden und der Gastrula als Einzelzellen aus und zeigen eine hohe Empfindlichkeit für teratogene Substanzen, wie man am Beispiel der Alkoholembryopathie nachweisen konnte (Smith et al. 2014; Sulik und Johnston 1981; Sulik 1984; Sulik et al. 1988). Befunde an Erwachsenen nach Einnahme von Thalidomid legen nahe, dass auch Thalidomid einen stärker schädigenden Einfluss auf viszero- und somatosensorische Fasern ausübt als auf die motorischen Fasern (McCredie 2007). Untersuchungen an mit Thalidomid behandelten Kaninchen konnten keine Unterschiede der motorischen Fasern im Vergleich zu Kontrollen erkennen, jedoch sehr wohl an den sensorischen Fasern (McCredie et al. 1984).

Während diese Befunde durchaus nachvollziehbar und aus der Entwicklung erklärbar sind, teile ich nicht die von McCredie dargelegte Auffassung, Thalidomid schädige primär die Zellen der Neuralleiste und andere Fehlbildungen, einschließlich der des Extremitätenskeletts, seien Sekundärfolgen des Neuralleistendefektes (McCredie und McBride 1973). Angeborene Stenosingen im Magen-Darmkanal entwickeln sich mit Ausnahme des Megacolon congenitum (M. Hirschsprung) durch fehlende Rekanalisierung von epithel-begrenzten Strukturen (Duodenum) oder Ausbleiben von Septierung und/oder Ruptur der Kloakenmembran (Analkanal). Auf das Skelett übt die Innervation nur wesentlich später als von McCredie postuliert, nämlich während der enchondralen Ossifikation der knorpelig angelegten Skelettelemente, einen Einfluss aus (Tomlinson et al. 2020). Die Knorpelanlagen selbst entstehen dagegen unabhängig von den Nerven.

Auch die experimentellen Arbeiten an Hühnerembryonen belegen aus meiner Sicht nicht den postulierten kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der

Neuralleiste (analysiert anhand der Spinalganglien) und den Extremitätenanlagen (Shoobridge et al. 1983). Die thermischen Eingriffe sind hierzu viel zu umfangreich und nicht präzise lokalisiert, wie die Autoren selbst einräumen. Jede Art von Eingriff, bei dem das Extremitätenfeld gestört wird, kann die Abwesenheit von Gliedmaßen zur Folge haben (eigene Beobachtungen an Hühnerembryonen). Hinzu kommt die aus meiner Sicht inadequate Verwendung des Begriffs „Sklerotom“ durch McCredie im Zusammenhang mit dem Skelett der Extremitäten. Unter Sklerotomen sind in der Entwicklungsbiologie Kompartimente der Somiten zu verstehen, die sich nicht an der Extremitätenentwicklung, sondern an Wirbelsäule und Rippen beteiligen (Christ und Wilting 1992; Christ und Ordahl 1995; Brand-Saberi et al. 1996; Ulfig und Brand-Saberi 2017).

Dass einzelne Nerven isoliert geschädigt werden ist grundsätzlich möglich, da sich die Manifestation von Störungen lokal, d.h. auf zellulärer Ebene entscheidet. Die Verläufe einzelner Nerven sind von jeweils eigenen physiologischen Engstellen betroffen. So wäre beim N. medianus beispielsweise ein Szenario denkbar, bei dem durch eine (möglicherweise nur einseitig) vorhandene A. mediana der Karpaltunnel eine Prädisposition zur Einengung des N. medianus aufweist und er damit für Funktionsbeeinträchtigungen durch Thalidomid empfindlicher sein könnte. Die embryonal regelmäßig vorhandene A. mediana unterliegt derzeit beim Menschen der Mikroevolution, die zur Folge hat, dass sie zunehmend auch nachgeburtlich erhalten bleibt (Lucas et al. 2020).

Nerven enthalten zudem in unterschiedlichem Ausmaß somatosensorische und somatomotorische Anteile. Unter den Nerven des Armes mit gemischten Faserqualitäten innervieren der N. radialis und der N. musculocutaneus die größten Hautareale, danach folgen der N. axillaris, N. medianus und N. ulnaris. Deshalb ist davon auszugehen, dass der Anteil an sensorischen Fasern (und damit verbunden die Anfälligkeit) in dieser Reihenfolge leicht abnehmend ist. Die Wahrscheinlichkeit, ob ein einzelner Nerv isoliert während der Pränatalzeit durch Thalidomid geschädigt sein kann, ohne dass äußerlich sichtbare Malformationen vorhanden sind, hängt also ebenfalls von mehreren Parametern wie Verlauf und Faserqualität und möglicherweise weiteren hier nicht benannten ab, erscheint jedoch grundsätzlich möglich.

6 Abschließende Betrachtung

Wie aus meinen obigen Ausführungen hervorgeht, ergibt sich aus der Komplexität des Entwicklungsgeschehens und der zunehmenden Erkenntnis der Bedeutung des Zufalls für dieselben, dass kein Phänotyp bei Thalidomid-Patient*innen prinzipiell von vornherein als von Thalidomid verursacht ausschließbar ist, wie es derzeit durch den DATE-Algorithmus durch Klassifikation in „wahrscheinlich“, „möglich“ und „unwahrscheinlich“ vorgeschlagen wird (Mansour et al. 2019). Wie aus Abb. 5 hervorgeht, würden die anhand einer niedrigen gewichteten Punktzahl als „unwahrscheinlich“ klassifizierten Patient*innen weder einer genetischen Überprüfung zum Ausschluss von Syndromen zugeführt, noch einer

„Abschließende(n) Bewertung durch einen Experten zur Bestätigung der TE“ zugänglich gemacht.

Hier sollte keine statistische Betrachtung gemacht werden, zumal aktuelle Fachliteratur nur in unzureichendem Maße Eingang in den DATE gefunden zu haben scheint (Terracini 2021). Entscheidungen ohne individuelle, auf dem Hintergrund aktueller molekularbiologischer und entwicklungsbiologischer Erkenntnisse, unter Abwägung aller bekannten individuellen Faktoren für Patient*innen zu treffen, erscheint mir weder angemessen, noch ethisch vertretbar. Genetische Analysen müssen bekannte Syndrome ausschließen können, auch die Epigenetik relevanter Kontrollgene könnte in die Diagnostik einbezogen werden und der DATE dahingehend angepasst werden.

Systematische Literaturrecherchen zu den beschriebenen Thalidomid-Fällen der 1960er Jahre, die eine genaue Statistik ermöglichen, fehlen und sind wahrscheinlich auch nicht mehr möglich. Bezüglich der Klassifizierung von Malformationen der oberen Extremitäten muss zu entnehmen sein, ob es sich dabei um das Swanson (1964) oder das Oberg-Manske-Tonkin-System (Oberg et al. 2010; Lam et al. 2020) handelt.

Weiterhin erscheint mir die Suche nach weiteren Neosubstraten von Cereblon-Thalidomid vielversprechend, die heute u.a. durch den immensen Fortschritt auf dem Gebiet der Bioinformatik und Systembiologie möglich wird. Voraussetzung hierfür wäre die Identifizierung von Cereblon in weiteren Entwicklungsprozessen von Wirbeltieren. Auch die Erforschung von CD147 und p63 als bereits identifizierte Neosubstrate wäre im Zusammenhang mit weiteren Entwicklungsvorgängen sinnvoll.

Neuerdings kann die menschliche Frühentwicklung durch induzierte pluripotente Stammzellen und daraus abgeleitete Embryoide, Organoide und Assembloide *in vitro* nachgestellt werden. Auf diese Weise kann die Entstehung von Malformationen an menschlichen Geweben erstmals untersucht werden (Schutgens und Clevers 2020). Erste Ergebnisse zur Wirkung von Thalidomid sind vielversprechend (Belair et al. 2020; Fan et al. 2022).

7 Danksagung

Für ihre fachliche Einschätzung und die wissenschaftlichen Diskurse im Vorfeld der Abfassung dieses Gutachtens sowie für wertvolle Anregungen zu weiteren Untersuchungen danke ich herzlich Herrn Professor Dr. E.-M. Füchtbauer (Aarhus Dänemark), Herrn Dr. med. M.A. Mensah (Berlin), Herrn Professor Dr. med. Ch. Viebahn (Göttingen), Frau Dr. S. Hoffjan (Bochum), Herrn Professor Dr. med. V. Krenn (Trier), Herrn PD Dr. M. Russwurm (Bochum) und Herrn Dr. med. D. Saberi (Göttingen).

8 Literatur

Al-Baradie R, Yamada K, St Hilaire C, Chan WM, Andrews C, McIntosh N, Nakano M, Martonyi EJ, Raymond WR, Okumura S, Okihiro MM, Engle EC (2002). Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1195-1199

Arlen RR, Wells PG (1990) Extracellular thiol-disulfide status reflecting chemical toxicity mediated via oxidative stress: Validation with paraquat and t-butylhydroperoxide, and implications for phenytoin and thalidomide teratogenicity. *FASEB J.* 4, A608

Arlen RR, Wells PG (1996) Inhibition of thalidomide teratogenicity by acetylsalicylic acid: evidence for prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation of thalidomide to a teratogenic reactive intermediate. *J. Pharm. Exp. Ther.* 277, 1649–58

Asatsuma-Okumura T, Ando H, De Simone M, Yamamoto J, Sato T, Shimizu N, Asakawa K, Yamaguchi Y, Ito T, Guerrini L, Handa H (2019) p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity. *Nature Chemical Biology* (2019) 15: 1077-1084

Ashby J, Tinwell H, Callander RD, Kimber I, Clay P, Galloway SM, Hill RB, Greenwood SK, Gaulden ME, Ferguson MJ, Vogel E, Nivard M, Parry JM, Williamson J. (1997) Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints. *Mutat Res.* 1997; 396(1-2):45-64

Beedie SL, Mahony C, Walker HM, Chau CH, Figg WD, Vargesson N (2016) Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model. *Sci Rep.* 2016a, 6: 30038

Belair DG, Lu G, Waller LE, Gustin JA, Collins ND, Kolaja KL (2020) Thalidomide Inhibits Human iPSC Mesendoderm Differentiation by Modulating CRBN-dependent Degradation of SALL4. *Sci Rep* 10, 2864 (2020).

Bénazet JD, Zeller R (2009) Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct;1(4): a001339.

Bourgeois P, Bolcato-Bellemin A, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F (1998) The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Human molecular genetics*, 7 (6): 945-957

Brand B, Christ B, Jacob HJ (1985) An experimental analysis of the developmental capacities of distal parts of avian leg buds. *Am J Anat.* 1985 Aug;173(4):321-40

Brand-Saberi B, Wilting J, Ebensperger C, Christ B (1996). The formation of somite compartments in avian embryos. *The International journal of developmental biology.* 40: 411-420

Britton G, Heemskerk I, Hodge R, Qutub AA, Warmflash A (2019) A novel self-organizing embryonic stem cell system reveals signaling logic underlying the patterning of human ectoderm. *Development* 146(20): dev179093

Cai J, Goodman BK, Patel AS, Mulliken JB, Van Maldergem L, Hoganson GE, Paznekas WA, Ben-Neriah Z, Sheffer R, Cunningham ML, Daentl DL, Jabs EW. (2003) Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. *Hum Genet.* 2003 Dec;114(1):68-76

Charité J, McFadden DG, Olson EN (2002) The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 2000; 127:2461–2470

Chaudhry V, Cornblath DR, Corse A, Freimer M, Simmons-O'Brien E, Vogelsang G. Thalidomide-induced neuropathy. *Neurology.* 2002;59(12): 1872–1875

Christ B, Wilting J (1992) From somites to vertebral column. *Ann Anat.* 1992 Feb;174(1):23-32

Christ B, Ordahl CP (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl).* 1995 May;191(5):381-96. Review

Curtin KD, Meinertzhagen IA, Wyman RJ (2005) Basigin (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture. *Journal of Cell Science* 118: 2649-2660

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 4082-4085

Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR (1995) Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature*, 375(6534): 791-795

De Logu F, Trevisan G, Marone IM, Coppi E, Dalenogare DP, Titiz M, Marini M, Landini L, Souza Monteiro de Araujo D, Li Pum S, Materazzi S, De Siena G, Gepetti P, Nassini R (2020) Oxidative stress mediates thalidomide-induced pain by targeting peripheral TRPA1 and central TRPV4. *BMC Biol* 18, 197

Deora AA, Gravotta D, Kreitzer G, Hu J, Bok D, Rodriguez-Boulan E (2004) The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium. *Mol Biol Cell.* 2004 Sep;15(9):4148-65

Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, Ebert BL, Fischer ES (2018) Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome. *Elife* 7 (2018) e38430

Durães F, Pinto M, Sousa E. (2018) Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals.* 2018; 11(2):44.

Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM (2013) Beyond GWASs: Illuminating the Dark Road from Association to Function. Review. *AJHG* 93, Issue 5, P779-797

Eichner R, Heider M, Fernández-Sáiz V, van Bebber F, Garz AK, Lemeer S, Rudelius M, Targosz BS, Jacobs L, Knorn AM, Slawska J, Platzbecker U, Germing U, Langer C, Knop S, Einsele H, Peschel C, Haass C, Keller U, Schmid B, Götze KS, Kuster B, Bassermann F (2016) Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nat Med*. 2016 22(7):735-43. Epub 2016 Jun 13

el Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J. (1997) Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*. 1997 Jan;15(1):42-46

Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P (2002) Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* 106:2257–2262

Fan P, Wang YH, Xu M, Han X, Liu Y (2022) The Application of Brain Organoids in Assessing Neural Toxicity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15 (2022); <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2022.799397>

Firulli AB, Conway SJ. (2008) Phosphoregulation of Twist1 provides a mechanism of cell fate control. *Curr Med Chem*. 2008;15(25):2641-2647

Fogel BJ, Nitowsky HM, Gruenwald, P (1965) Discordant abnormalities in monozygotic twins. *The Journal of Pediatrics*, Volume 66, Number 1, part 1

Folkman J, D'Amore PA. *Cell* (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996 87(7):1153-5

Franks ME, Macpherson GR, Figg WD (2004) Thalidomide. *Lancet* 363(9423):1802-11

Gale NW, Yancopoulos GD (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*. 1999 13(9):1055-66

Gasser RF, Cork RJ, Stillwell BJ, McWilliams DT (2014) Rebirth of human embryology. *Dev Dyn*. 2014 May;243(5):621-628

Gierer A, Meinhard H (1972) A theory of biological pattern formation. *Kybernetik*. 1972 12(1):30-9

Goda M, Takatori SH, Atagi S, Hashikawa-Hobara N, Kawasaki H (2016) Nerve growth factor facilitates perivascular innervation in neovasculatures of mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 131, 251-258

Goldbeter A, Dupont G, Berridge MJ (1990) Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc. Natl Acad Sci USA* 87, 1461–1465

Goldbeter A (2018) Dissipative structures in biological systems: bistability, oscillations, spatial patterns and waves. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2018 Jul 28; 376 (2124) :20170376

Gripp KW, Zackai EH, Stolle CA. (2000) Mutations in the human TWIST gene. *Hum Mutat.* 2000;15(2):150-155. Erratum in: *Hum Mutat* 2000;15(5):479. PMID: 10649491.

Grotewold L, Ruether, U (2002) The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *The EMBO Journal* Vol. 21 No. 5 pp. 966-975

Hansen JM, Harris C (2004) A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NFkappaB pathway. *Antioxid Redox Signal* 6: 1–14

Hansen JM, Harris C (2013) Redox control of teratogenesis. *Reprod Toxicol* 35: 165–179

Hansen JM, Gong SG, Philbert M, Harris C (2002) Misregulation of gene expression in the redox-sensitive NF-kappa b-dependent limb outgrowth pathway by thalidomide. *Dev Dyn* 225: 186–194

Hardy A, Richardson MK, Francis-West PH, Rodriguez C, Izpisua-Belmonte JC, Duprez D, Wolpert L (1995) Gene expression, polarising activity and skeletal patterning in reaggregated hind limb mesenchyme. *Development* 1995; 121 (12): 4329–4337

Haristos E (1983) Zur sensiblen Phase der Thalidomid-Embryopathie. Eine Analyse von 245 Fällen mit datierten Rezepten. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 1983

Haus AH, Kohlhase J, Käsmann B, Seitz B (2008) Duane-Anomalie und radiale Gliedmaßenfehlbildungen. *Ophthalmologie* 2008; 105: 588–591

Hess B, Boiteux A (1971) Oscillatory Phenomena in Biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* 1971 40:1, 237-258

Hobson MI, Brown R, Green CJ, Terenghi G (1997) Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. *British Journal of Plastic Surgery* (1997), 50, 125-131

Hori K, Katayama N, Kachi S, Kondo M, Kadomatsu K, Usukura J, Muramatsu T, Mori S, Miyake Y (2000) Retinal dysfunction in basigin deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3128–3133

Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW (1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):36-41

Jabs EW (2004) TWIST and Saethre-Chotzen Syndrome in Inborn errors of development: the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis. Epstein, CJERP.; Wynshaw-Boris, A., editors. Oxford University Press; Oxford: 2004. p. 401-409

Isaeva VV (2012) Self-organization in biological systems. *Biol Bull Russ Acad Sci* 2012; 39: 110–118

Ito T, Handa H (2012) Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenit Anom* 52:1–7

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327:1345–1350

Ito T, Ando H, Handa H (2011) Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 68:1569–1579

Kazuki Y, Akita M, Kobayashi K, Osaki M, Satoh D, Ohta R., Abe S, Takehara S, Kazuki K, Yamazaki H, Kamataki T, Oshimura M (2016) Thalidomide-induced limb abnormalities in a humanized CYP3A mouse model. *Sci. Rep.* 6:21419

Knobloch J, Shaughnessy JD Jr, Ruther U (2007) Thalidomide induces limb deformities by perturbing the bmp/dkk1/wnt signaling pathway. *FASEB J* 21:1410–1421

Kohlhase J, Holmes LB (2004) Mutations in *sall4* in malformed father and daughter postulated previously to reflect mutagenesis by thalidomide. *Birth Defects Res A* 70:550–551

Kohlhase J, Schubert L, Liebers M, Rauch A, Becker K, Mohammed SN, Newbury-Ecob R, Reardon W (2003) Mutations at the *SALL4* locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping Phenotypes, including Okhiro syndrome, Holt -Oram syndrome, acrorenal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. *J Med Genet.* 2003, 40: 473–8

Kondo S, Miura T (2010) Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science* (2010) 329:1616-1620

Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Arruda EP, Kathiriya IS, Mo R, Hui CC, Srivastava D and Bruneau BG (2006). Cooperative and antagonistic interactions between *Sall4* and *Tbx5* pattern the mouse limb and heart. *Nat. Genet.* 38, 175-183

Kowalski TW, Gomes JDA, Garcia GBC, Fraga LR, Paixao-Cortes VR, Recamonde-Mendoza M, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L, Vianna FSL (2020) CRL4-Cereblon complex in Thalidomide Embryopathy: a translational investigation. *Sci Rep.* 2020 Jan 21;10(1):851

Kreipe U (1967) Missbildungen innerer Organe bei Thalidomidembryopathie. Ein Beitrag zur Bestimmung der sensiblen Phase bei Thalidomideinnahme in der Frühschwangerschaft. Arch Kinderheilkd 1967; 176:33-660

Krishan K, Kanchan T, Thakur S (2019) A study of morphological variations of the human ear for its applications in personal identification. 9. 1-11. 10.1186/s41935-019-0111-0.

Lam WL, Oberg KC, Goldfarb CA (2020) The 2020 Oberg–Manske–Tonkin classification of congenital upper limb differences: updates and challenges. Journal of Hand Surgery (European Volume). 2020;45(10):1117-1119

Lee CJJ, Goncalves LL, Wells PG (2011) Embryopathic effects of thalidomide and its hydrolysis products in rabbit embryo culture: evidence for a prostaglandin H synthase (PHS)-dependent, reactive oxygen species (ROS)-mediated mechanism. FASEB J 25: 2468–2483

Lenz W (1961) Diskussionsbemerkung von Privatdozent Dr. W. Lenz, Hamburg zu dem Vortrag von R. A. Pfeiffer und K. Kosenow: Zur Frage der exogenen Entstehung schwerer Extremitätenmißbildungen. Tagung der Rheinisch-Westfälischen Kinderärztereinigung in Düsseldorf am 19.11.1961. BA Koblenz B 189-11733

Lenz W (1962) Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 1:271–272

Lenz W, Knapp K (1962) Die Thalidomid-Embryopathie. Dtsch Med Wochenschr 1962; 87:1232-1242

Lewandoski M, Sun X, Martin GR. (2000) Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. Nat Genet. 2000 Dec;26(4): 460-463

Lucas T, Kumaratilake J, Henneberg M (2020) Recently increased prevalence of the human median artery of the forearm: A microevolutionary change. J. Anat. 2020; 237: 623– 631

Mansour S, Baple E, Hall CM (2019) A clinical review and introduction of the diagnostic algorithm for thalidomide embryopathy (DATE). J Hand Surg Eur Vol 2019;44(1):96-108

McBride WG (1961) Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 278 (7216) 1358

McBride WG (1994) Thalidomide may be a mutagen. BMJ. 308: 1635–1636

McCredie J (2007) Beyond Thalidomide: Birth defects explained. Royal Society of Medicine Press Ltd

McCredie J, McBride WG (1973) Some congenital abnormalities: possibly due to embryonic peripheral neuropathy. Clin Radiol 24: 204–211

McCredie J, North K, de longh R (1984) Thalidomide deformities and their nerve supply. J Anat 1984; 139: 397-410

Mercker M, Brinkmann F, Marciniak-Czochra A, Richter T (2016). Beyond Turing: mechanochemical pattern formation in biological tissues. *Biol. Direct* 11, 22

Miura T (2013). Turing and Wolpert work together during limb development. *Sci. Signal.* 6, pe14

Miller MT, Strömland KK (1999) Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology.* 1999, 60: 306–21

Miller MT, Strömland KK (2011) What can we learn from the thalidomide experience: an ophthalmologic perspective. *Curr Opin Ophthalmol.* 2011, 22: 356–64

Mlak R, Szudy-Szczyrek A, Mazurek M, Szczyrek M, Homa-Mlak I, Mielnik M, Chocholska S, Jankowska-Łęcka O, Małecka-Massalska T, Hus M (2019), Polymorphisms in the promotor region of the CRBN gene as a predictive factor for peripheral neuropathy in the course of thalidomide-based chemotherapy in multiple myeloma patients. *Br J Haematol*, 186: 695-705

Mori Y, Takahashi N, Polat OK, Kurokawa T, Takeda N, Inoue M (2016) Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflugers Arch.* 016; 468(1):85–97

Müller P, Rogers KW, Jordan BM, Lee JS, Robson D, Ramanathan S, Schier AF (2012) Differential diffusivity of Nodal and Lefty underlies a reaction-diffusion patterning system. *Science* 336, 721–724

Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Izpisua Belmonte JC, Westphal H (2001) Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell.* 2001; 423-434

Newman SA, Forgacs G (2005) Complexity and self-organization in biological development and evolution. In: *Complexity in Chemistry, Biology and Ecology*, pp.49-95 Danail Bonchev und Dennis H. Rouvray (eds.), *Mathematical and Computational Chemistry Series* Editor: Paul G. Mezey. Springer, New York, NY

Ng SS, Gutschow M, Weiss M, Hauschildt S, Teubert U, Hecker TK, Luzzio FA, Kruger EA, Eger K, Figg WD (2003) Antiangiogenic activity of N-substituted and tetrafluorinated thalidomide analogues. *Cancer Res* 63:3189–3194

Nowack E (1965) Die sensible Phase bei der Thalidomid-Embryopathie. *Humangenetik* 1965; 1:516-536

- Oberg KC, Feenstra JM, Manske PR, Tonkin MA (2010) Developmental biology and classification of congenital anomalies of the hand and upper extremity. *J Hand Surg Am.* 2010;35(12):2066–2076
- Ochinsky S, Verroust J, Bastuji-Garin S, Gherardi R, Revuz J (1994) Thalidomide neuropathy incidence and clinicoelectrophysiological findings in 42 patients. *Arch Dermatol* 1994; 130:66-69
- O’Rahilly R, Müller F (2001) *Human Embryology & Teratology*. 3rd edition. New York: John Wiley and Sons Inc; 2001
- Parman T, Chen G, Wells PG (1998) Free radical intermediates of phenytoin and related teratogens. Prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation, electron paramagnetic resonance spectrometry, and photochemical product analysis. *J. Biol. Chem.* 273, 25079–88
- Perez-Gomez R, Haro E, Fernandez-Guerrero M, Bastida MF, Ros MA (2018) Role of Hox genes in regulating digit patterning. *Int. J. Dev. Biol.* (2018) 62: 797-805
- Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodriguez-Rey JC, Ros MA (1998) Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94, 319–324
- Price DK, Ando Y, Kruger EA, Weiss M, Figg WD (2002) 5’-OH-thalidomide, a metabolite of thalidomide, inhibits angiogenesis. *Ther Drug Monit* 24:104–110
- Prigogine I, Lefever R, Goldbeter A, Herschkowitz-Kaufman M (1969) Symmetry-breaking instabilities in biological systems. *Nature* 223, 913–916
- Ramsay J, Taylor D. (1980) Congenital crocodile tears: a key to the etiology of Duane’s syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1980; 64:518–522
- Rani D, Krishan K, Sahani R, Baryah N, Kanchan T (2021) Variability in human external ear anthropometry-Anthropological and forensic applications *Clin Ter* 2021; 172 (6):531-541
- Recho P, Hallou A, Hannezo E (2019) Theory of mechanochemical patterning in biphasic biological tissues. *PNAS* 5344–5349, Vol. 116, No. 12
- Richardson P, Hideshima T, Anderson K (2002) Thalidomide: Emerging Role in Cancer *Medicine Annual Review of Medicine* 2002 53:1, 629-657
- Riddle RD, Johnson R L, Laufer E, Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401–1416
- Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R (2006) The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development, *Development* 133 (15): 3005–3013

- Samoilov VI, Vasil'ev YuM (2009) Mechanisms of Social Behavior of Tissue Cells of Vertebrates: Cultural Models. *Zh. Obshch. Biol.*, 2009, vol. 70, pp. 239–244
- Schmidt M, Salzano FM (1980) Dissimilar effects of thalidomide in dizygotic twins. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 29:295–297
- Schmidt M, Salzano FM (1983) Clinical studies on teenage Brazilian victims of thalidomide. *Braz J Med Biol Res* 1983; 16:105–109.
- Schnakenberg J (1979) Simple chemical reaction systems with limit cycle behaviour. *J. Theor. Biol.* 81: 389–400
- Schuler-Faccini L, Soares RC, de Sousa AC, Maximino C, Luna E, Schwartz IV, Waldman C, Castilla EE (2007) New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Research (Part A)* 79: 671–672
- Schutgens F, Clevers H (2020) Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annu Rev Pathol.* 2020; 15:211-234
- Serrano Morales J, Raspopovic J, Marcon L (2021) From embryos to embryoids: How external signals and self-organization drive embryonic development. *Stem Cell Reports*, Vol. 16: 1039–1050
- Sharpe J und Green JBA (2015) Positional information and reaction-diffusion: two big ideas in developmental biology combine. *Development.* 142: 1203–1211
- Shiratori H, Yashiro K, Shen MM, Hamada H (2006) Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. *Development* 133: 3015–3025
- Shoobridge R, Velkou D, McCredie J (1983) Neural crest ablation and limb morphogenesis. *J Exp Zool* 1983; 225: 73-87
- Shyer A, Rodrigues AR, Schroeder GG, Kassianidou E, Kumar S, Harland RM (2017) Emergent cellular self-organization and mechanosensation initiate follicle pattern in the avian skin. *Science* 357, 811–815
- Smith SM, Garic A, Flentke GR, Berres ME (2014) Neural crest development in fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014 Sep;102(3):210-220
- Smithells RW (1962) Thalidomide and malformations in Liverpool. *Lancet* 1962;1(7242): 1270-1273
- Smithells RW (1973) Defects and disabilities of thalidomide children. *Br Med J* 1973;1(5848):269-272

Smithells RW, Newman CGH (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 1992; 29: 716-723

Somers GS (1962) Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 1(7235): 912-913

Streeter GL (1942) Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites and age group XII, 21 to 29 somites. *Contrib Embryol Carnegie Inst.* 1942; 30:211-245

Streeter GL (1945) Developmental horizons in human embryos. Description of age group XIII, embryos about 4 to 6 mm long, and age group XIV, period of indentation of the lens vesicle. *Contrib Embryol Carnegie Inst.* 1945; 31:27-63

Streeter GL (1948) Developmental horizons in human Embryos. Description of age groups XV, XVI, XVII and XVIII, being the third issue of a survey of the Carnegie Collection. *Contrib Embryol Carnegie Inst.* 1948; 32:133-203

Streeter GL (1951) Developmental horizons in human embryos; description of age groups XIX, XX, XXI, XXII, and XXIII being the fifth issue of a survey of the Carnegie collection. *Contrib Embryol Carnegie Inst.* 1951; 34:165-196

Strömmland K, Philipson E, Andersson Gronlund M (2002) Offspring of male and female parents with thalidomide embryopathy: birth defects and functional anomalies. *Teratology* 66 (3) (2002): 115-121

Sulik KK (1984) Critical periods for alcohol teratogenesis in mice, with special reference to the gastrulation stage of embryogenesis. In: *Mechanisms of Alcohol Damage in Utero*. Ciba Foundation Symposium 105: Pitman, London. pp. 124-141

Sulik KK, Johnston MC, Webb MA (1981) Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science*. 1981; 214:936-938

Sulik KK, Cook CS, Webster WS (1988) Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development*. 1988; 103(suppl): 213-232

Swanson AB (1964) A classification for congenital malformations of the hand. *N J Bull Acad Med.* 1964; 10:166 -169

Taïb S, Lamandé N, Martin S, Couplier F, Topilko P, Brunet I (2022) Myelinating Schwann cells and Netrin-1 control intra-nervous vascularization of the developing mouse sciatic nerve. *eLife* 2022;11: e64773

Tallinen T, Chung JY, Rousseau F, Girard N, Lefèvre J, Mahadevan L (2016) On the growth and form of cortical convolutions. *Nature Physics*, VOL 12: 588-593

- Temtamy SA, Shoukry AS, Ghaly I, El-Meligy R, Boulos SY (1975) The Duane radial dysplasia syndrome: an autosomal dominant disorder. *Birth Defects* 1975; XI:344-345
- Terracini B (2021) Thalidomide e difetti monolaterali degli arti: il capitolo italiano di una storia infinita. *Epidemiol Prev* 2021; 45 (4):302-309
- Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N. (2009) Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8573–8578
- Tomlinson RE, Christiansen BA, Giannone AA, Genetos DC (2020) The Role of Nerves in Skeletal Development, Adaptation, and Aging. *Frontiers in Endocrinology* 11; <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2020.00646>
- Tonkin M, Oberg K (2013) Congenital hand I: Embryology, classification, and principles. In: Neligan P, Chang J, eds. *Plastic Surgery*, 3rd ed, vol 6. London: Elsevier Saunders; 2013
- Tonkin MA, Tolerton SK, Quick TJ, Harvey I, Lawson RD, Smith NC, Oberg KC (2013) Classification of Congenital Anomalies of the Hand and Upper Limb: Development and Assessment of a New System. *The Journal of Hand Surgery* 38 (9): 1845-1853
- Torres M, Giraldez F (1998) The development of the vertebrate inner ear. *Mechanisms of Development* 71 (1998) 5–21
- Turing MA (1952) The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 237: 37–72
- Turney BW, Rowan-Hull AM, Brown JM (2003) The innervation of FGF-induced additional limbs in the chick embryo. *J Anat.* 2003; 202(1): 83-92
- UK Government Report (1964) Deformities caused by Thalidomide. In: *Reports on Public Health and Medical Subjects*. No. 112. ed. Ministry of Health. London: HMSO
- Ulfig N und Brand-Saberi B (2017) *Kurzlehrbuch Embryologie*, 3. Auflage
- Vargesson, N (2015) Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defect Res C*, 105: 140-156
- Venzin OF, Oates AC (2020) What are you synching about? Emerging complexity of Notch signaling in the segmentation clock, *Developmental Biology* 2020; 460: 40-54
- Wang H, Zhu H, Guo Q, Qian T, Zhang P, Li S, Xue C, Gu X (2017) Overlapping Mechanisms of Peripheral Nerve Regeneration and Angiogenesis Following Sciatic Nerve Transection *Front Cell Neurosci.* 2017 11:323
- Wang Y, Wang X, Wohland T, Sampath K (2016) Extracellular interactions and ligand degradation shape the nodal morphogen gradient. *eLife* 5, e13879

Wolpert L (1969) Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25 (1): 1–47

Xu C, Yang X, Zhou H, Li Y, Xing C, Zhou T, Zhong D, Lian C, Yan M, Chen T, Liao Z, Gao B, Su D, Wang T, Sharma S, Mohan C, Ahituv N, Malik S, Li QZ, Su P (2020) A novel ZRS variant causes preaxial polydactyly type I by increased sonic hedgehog expression in the developing limb bud. *Genet Med.* 2020 Jan; 22(1):189-198

Zug R (2022) Developmental disorders caused by haploinsufficiency of transcriptional regulators: a perspective based on cell fate determination. *Biol Open* 15 January 2022; 11 (1): bio058896.