

**„INDUKTION UND DIFFERENZIERUNG
DER PROEPIKARDIALEN SEROSA:
ANALYSE EINER VORLÄUFERZELLPOPULATION
DES EMBRYONALEN HERZENS“**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Inga Schulte
aus Hildesheim

Göttingen 2007

D7

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Ernst Wimmer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Tomas Pieler

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	4
2.1.	Spezifizierung und Determination des Myokards.....	4
2.2.	Rolle von Endoderm, Neuroektoderm und Chorda dorsalis in der Entwicklung der Herzfelder	5
2.3.	Etablierung der schlauchförmigen Herzanlage	7
2.4.	Umwandlung des geraden Herzschlauchs in die Herzschleife	8
2.5.	Rekrutierung primär extrakardialer Vorläuferzellen.....	10
2.5.1.	Das Proepikard	11
2.5.2.	Proepikardiale Markergene	12
2.5.3.	Entwicklung des Proepikards und Arten des Transfers der Vorläuferzellen zum Herzen	13
2.5.4.	Derivate des Proepikards.....	15
2.5.4.1.	Epikard	15
2.5.4.2.	Bildung von Subepikard und epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	16
2.5.4.3.	Koronargefäßsystem.....	17
2.5.4.4.	Allgemeine Lymphgefäßentwicklung	18
2.5.4.5.	Das koronare Lymphgefäßsystem	18
2.6.	Ziele der Arbeit	20
3.	MATERIAL UND METHODEN	22
3.1.	Material	22
3.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmittel	22
3.1.2.	Geräte, Computerprogramme.....	22
3.1.3.	Proteine, Wachstumsfaktoren und Antikörper.....	23
3.1.4.	Enzyme, DNA-Marker	23
3.1.5.	Bakterienstämme und Vektoren	24
3.1.6.	Zelllinien	24
3.1.7.	Hühnerembryonen, Wachtelembryonen	24
3.1.8.	Mausstamm	24
3.1.9.	Sonden für <i>Whole mount-in situ</i> -Hybridisierungen	25
3.2.	Methoden	25
3.2.1.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	25
3.2.1.1.	Mini-Präparation	25
3.2.1.2.	Midi-Präparation	26
3.2.2.	Analytische Agarosegelelektrophorese	26
3.2.3.	Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen.....	27
3.2.4.	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	27
3.2.4.1.	Analytische Restriktion	27
3.2.4.2.	Präparative Restriktion	28
3.2.5.	DNA-Quantifizierung	29
3.2.5.1.	Spektrophotometrische Quantifizierung.....	29
3.2.5.2.	Quantifizierung anhand Agarosegelelektrophorese	29
3.2.6.	Plasmid-DNA-Übertragung in Bakterienzellen	29
3.2.6.1.	Präparation der hochkompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	30
3.2.6.2.	Transformation	30
3.2.7.	Herstellung von Glycerin-Stocks	31
3.2.8.	<i>Whole mount</i> -RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	31
3.2.8.1.	<i>In vitro</i> -Transkription	31

3.2.8.2.	Vorbehandlung	32
3.2.8.3.	Hybridisierung	34
3.2.8.4.	Post-Hybridisierung.....	35
3.2.8.5.	Antikörperadsorption und anschließende Waschschr Hühnerembryonen	35
3.2.8.6.	Antikörperadsorption und anschließende Waschschr Mausembryonen	37
3.2.8.7.	Färbung.....	37
3.2.8.8.	Photographische Dokumentation	38
3.2.9.	Immunhistochemische Verfahren	38
3.2.9.1.	Indirekte Immunhistochemie.....	38
3.2.9.1.1.	Vorbehandlung der Embryonen	39
3.2.9.1.2.	Antikörperadsorption und Färbung	39
3.2.9.1.3.	Photographische Dokumentation	40
3.2.10.	Kultivierung von überexprimierenden Zelllinien und Kontrollzelllinien	40
3.2.10.1.	Aggregation tierischer Zellen für die Implantation	41
3.2.11.	Manipulation von Hühnerembryonen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	41
3.2.11.1.	<i>Whole embryo</i> -Kultur	41
3.2.11.2.	1. Experiment (in der <i>Whole embryo</i> -Kultur): Mechanisch induzierte Inversion der Körperrotation	42
3.2.11.3.	2. Experiment: Organkulturen	42
3.2.11.4.	Entwicklung experimenteller Verfahren zur Testung möglicher Proepikard induzierender und hemmender Faktoren	43
3.2.11.4.1.	1. Experiment: Implantation von <i>Beads</i> und Zellaggregaten in <i>Whole embryo</i> -Kulturen.....	43
3.2.11.4.2.	2. Experiment: Implantation von <i>Beads</i> und Zellaggregaten in Organkulturen	43
3.2.11.4.3.	3. Experiment: Proepikardiale Gewebekulturen.....	44
3.2.11.5.	Herstellung von Wachtel/Huhn-Chimären	44
3.2.12.	Herstellung der histologischen Präparate	45
3.2.13.	Rasterelektronenmikroskopie.....	45
4.	ERGEBNISSE	46
4.1.	Teil 1: Topogenese des Proepikards im Hühner- und Mausembryo.....	46
4.1.1.	Lagebeziehungen zwischen dem Proepikard und benachbarten Gewebe im Hühner- und Mausembryo	52
4.2.	Teil 2: Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo nach experimentellen Änderungen der topographischen Beziehungen der Proepikardanlagen zum Dottersackmesoderm und dem Kammermyokard.....	54
4.2.1.	Mechanisch induzierte Inversion der Körperrotation in der <i>Whole embryo</i> -Kultur	54
4.2.2.	Die Proepikardentwicklung in der Organkultur	57
4.3.	Teil 3: Entwicklung von experimentellen Verfahren zur Testung der direkten Steuerung durch rechts/links-seitenspezifische Signale	59
4.3.1.	1. Testverfahren: Applikation Faktoren beladener Trägermaterialien in <i>Whole embryo</i> -Kulturen	59
4.3.2.	2. Testverfahren: Applikation Faktoren beladener Trägermaterialien in Organkulturen	60
4.3.3.	3. Testverfahren: Proepikardiale Gewebekulturen.....	61
4.4.	Teil 4: Entwicklung des koronaren Lymphgefäßsystems	61

4.4.1.	Darstellung des koronaren Lymphgefäßsystems mit dem Lymphendothelmarker Prox1.....	61
4.4.2.	Erzeugung von Wachtel/Huhn-Chimären zur Klärung der Frage, ob proepikardiale Vorläuferzellen an der Entwicklung des koronaren Lymphgefäßsystems beteiligt sind.....	64
5.	DISKUSSION	67
5.1.	Teil 1: Topogenese des Proepikards im Hühner- und Mausembryo.....	68
5.1.1.	Besteht ein Zusammenhang zwischen der Topogenese des Proepikards und seinem Transfermechanismus?	69
5.2.	Teil 2: Ist die Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo direkt mit der Spezifizierung der rechts- und linksseitigen Körperidentitäten verbunden?	70
5.2.1.	Wird die Entwicklung der linken Proepikardanlage durch die früher entstehende rechte Anlage gehemmt?	73
5.3.	Teil 3: Entwicklung experimenteller Verfahren zur Identifizierung Proepikard induzierender und inhibierender Faktoren.....	75
5.4.	Teil 4: Differenzierung der proepikardialen Vorläuferzellpopulation	77
5.4.1.	Liefert das Proepikard Vorläuferzellen für das koronare Lymphgefäßsystem?	77
6.	LITERATUR	79
7.	ANHANG	93
7.1.	Abkürzungen und Nomenklaturregeln	93
7.2.	Publikationen	94
8.	DANKSAGUNG	95
9.	LEBENS LAUF	96

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden Aspekte der Induktion und Differenzierung des Proepikards im Hühnerembryo untersucht.

Das Proepikard ist eine primär extrakardiale Vorläuferzellpopulation, die die Zellen des Epikards, die Hauptmasse des kardialen Interstitiums sowie sämtliche Zellen des koronaren Gefäßsystems liefert. Die proepikardiale Serosa besteht aus Mesothel- und Mesenchymzellen, die der Wand der embryonalen Perikardhöhle (parietales Perikard) entstammen. Sie bildet sich im Bereich des venösen Pols des embryonalen Herzschlauchs. Im Hühnerembryo werden im Hamburger und Hamilton (HH)-Stadium 13/14 (3. Bebrütungstag) auf der ventralen Wand des rechten Sinushorns vesikuläre Aufwölbungen des Mesothels sichtbar, die zu einer blumenkohlartigen Ansammlung von Mesothelzotten auswachsen (Männer et al., 2001). Die Spitzen dieser Mesothelzotten bilden im HH-Stadium 16/17 (3./4. Bebrütungstag) feste Kontakte mit der dorsalen Wand des Ventrikels aus. Nach Ausbildung einer sekundären Gewebebrücke breitet sich von deren Anheftungsstelle ausgehend das primitive Epikard über die ursprünglich nackte Myokardoberfläche aus (Männer, 1992). Durch epithelial-mesenchymale Transformation des primitiven Epikards entstehen Mesenchymzellen, die die subepikardialen, myokardialen und subendokardialen Schichten der Herzwand besiedeln. Diese Zellen differenzieren sich zu Bindegewebszellen, sowie Endothel- und glatten Muskelzellen des koronaren Blutgefäßsystems.

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Aspekte der Proepikardentwicklung wie z. B. die epithelial-mesenchymale Transformation, die Entwicklung der Koronargefäße und das epikardabhängige Myokardwachstum näher untersucht. Hingegen ist über die Faktoren, die an der Induktion des Proepikards beteiligt sind, nichts bekannt.

Die vorliegende Arbeit umfasst 4 Teilstudien, in denen Aspekte der Proepikardinduktion und –differenzierung untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Informationen über die genaue räumliche und zeitliche Entwicklung des Proepikards sowohl im Hühner- als auch im Mausembryo bisher als unzureichend anzusehen sind, war das Ziel der ersten Teilstudie, exakte Daten über die Entwicklung des Proepikards

in beiden Spezies zu gewinnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich das Proepikard im Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen und im Mausembryo in einem bilateral symmetrischen Muster bildet. Weiter zeigte sich, dass sich im Hühnerembryo nicht nur die Proepikardanlagen unterschiedlich entwickeln, sondern dass auch die topographischen Beziehungen der beiden Anlagen zu benachbarten Geweben wie dem Dottersackmesoderm und dem Kammermyokard der Herzschleife unterschiedlich sind.

Basierend auf den oben genannten Befunden wurde in einer zweiten Teilstudie die Frage untersucht, ob die asymmetrische Proepikardentwicklung möglicherweise auf den Einfluss benachbarter Gewebe zurückzuführen sein könnte. Es wurde geprüft, ob das Dottersackmesoderm aufgrund seiner Nähe zur rudimentären linken Proepikardanlage eine inhibierende und das der rechten Proepikardanlage naheliegende Kammermyokard eine induzierende Wirkung auf deren Entwicklung haben könnten. In zwei verschiedenen Experimenten wurde, dass die beiden untersuchten Gewebe keinen wesentlichen Einfluss auf die Induktion und Hemmung der proepikardialen Anlagen haben. Aufgrund dieses Befundes kann vermutet werden, dass die asymmetrische Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo durch rechts/links-seitenspezifische Signale gesteuert wird.

Das Ziel der dritten Teilstudie war die Entwicklung experimenteller Verfahren zur Testung verschiedener Faktoren auf ihre mögliche Proepikard induzierende bzw. Proepikard hemmende Wirkung. Aufbauend auf dem Befund, dass sich die beiden proepikardialen Anlagen des Hühnerembryos in einem bilateral asymmetrischen Muster bilden, sollten in diesen Testverfahren bereits identifizierte Faktoren unilateral im Bereich des Sinus venosus appliziert werden, wodurch das Wachstum der linken proepikardialen Anlage induziert bzw. das der rechten Anlage gehemmt werden sollte. Als Kandidat wurde hierfür der Faktor Bmp4 gewählt, von dem bereits bekannt ist, dass er im Proepikard des Hühnerembryos in einem asymmetrischen Muster exprimiert wird. Da lediglich Bmp2 rekombinant vorhanden war und es *in vitro* eine sehr ähnliche Wirkung zeigt wie Bmp4, wurde während der Entwicklung der Testverfahren der Faktor Bmp2 verwendet.

Aufgrund von technischen Problemen, deren Ursachen in der speziellen Morphologie und Physiologie der Proepikardregion lagen, konnte leider kein entsprechendes

experimentelles Verfahren entwickelt werden, das eine zuverlässige und reproduzierbare Aussage über eine mögliche Proepikard induzierende oder hemmende Wirkung von Bmp2 ermöglicht hätte.

In der vierten Teilstudie wurde die Differenzierung des Proepikards im Hühnerembryo behandelt. Wie bekannt war, liefert das Proepikard das Epikard, die Zellen des koronaren Blutgefäßsystems und den größten Teil des kardialen Interstitiums. Es stellte sich die Frage, ob noch weitere Strukturen des embryonalen Herzens ihren Ursprung in den proepikardialen Zellen haben könnten. Ein Kandidat, dessen Herkunft bislang nicht geklärt wurde, war das kardiale Lymphgefäßsystem. Durch den Einsatz des Lymphendothelmarkers Prox1 war es in der vorliegenden Arbeit möglich, die Entwicklung des kardialen Lymphgefäßsystems immunhistochemisch zu dokumentieren. Um zu prüfen, ob die kardialen Lymphgefäße vom Proepikard abstammen, wurden Wachtel/Huhn-Chimären konstruiert, bei denen das Proepikard einer Wachtel im HH-Stadium 16 in einen altersentsprechenden Hühnerembryo transplantiert wurde. Nach einer Reinkubation bis zum 15. Bebrütungstag wurden Fluoreszenzdoppelfärbungen mit dem Wachtelendothel spezifischen Antikörper QH1 und dem Lymphendothel spezifischen Antikörper Prox1 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachtelproepikard zwar die Zellen des Epikards, des koronaren Blutgefäßsystems und einen Großteil der kardialen Bindegewebszellen lieferte, jedoch nicht an der Bildung des Endothels der kardialen Lymphgefäße beteiligt ist.

2. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung des Proepikards. Hierbei handelt es sich um eine embryonale Vorläuferzellpopulation, die den embryonalen Herzschauch während der frühen Phase der Organogenese besiedelt. Diese primär extrakardial gelegene Vorläuferzellpopulation liefert Gewebe, die den weiteren Verlauf der Herzentwicklung beeinflussen und sich zu wichtigen Strukturelementen des reifen Herzens differenzieren. In den folgenden Abschnitten sollen vorangehend einige Informationen über den Ablauf der frühen Herzentwicklung vermittelt werden, die für das Verständnis der weiteren Ausführungen hilfreich sind.

2.1. Spezifizierung und Determination des Myokards

Das Herz ist das erste Organ im Wirbeltierembryo, das seine definitive Funktion aufnimmt. Im Hühnerembryo beginnen sich Myokardzellen bereits am 2. Bebrütungstag (HH-Stadium 9/10) im zu diesem Zeitpunkt noch linearen Herzschauch zu kontrahieren. Im Mausembryo lassen sich erste myokardiale Kontraktionen um den embryonalen Tag (ED = *embryonic day*) 8.0 beobachten. Die Spezifizierung und Determination der myokardialen Zellen finden allerdings zu einem bedeutend früheren Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung statt, was am Beispiel des Hühnerembryos erläutert werden soll.

Zu Beginn der Gastrulation (HH-Stadium 3, 1. Bebrütungstag) befinden sich im anterioren Drittel des Primitivstreifens Zellen, die im weiteren Verlauf der Entwicklung zu Herzmuskelzellen differenzieren (Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Rosenquist, 1970). Zudem liegen in der Nähe des anterioren Drittels des Primitivstreifens vereinzelt weitere myokardiale Vorläuferzellen im Epiblasten. Diese Vorläuferzellen nehmen hier bereits die anterior-posteriore Anordnung ein, die der späteren Gliederung des tubulären Herzens in Ausflussbahn, Ventrikel und dem Vorhofbereich entspricht.

Bis zum HH-Stadium 5 wandern myokardiale Vorläuferzellen in das Seitenplattenmesoderm der anterioren Hälfte der Keimscheibe ein und bilden hier bilateral symmetrische Areale seitlich des Primitivstreifens und der Chorda dorsalis.

Diese paarigen Areale werden als Herzfelder bezeichnet. Das ursprünglich einlagige Seitenplattenmesoderm der Herzfelder wird durch die Bildung des intraembryonalen Zöloms in zwei Schichten aufgespalten, die als splanchnisches und somatisches Mesoderm bezeichnet werden. Das splanchnische Blatt ist mit dem Endoderm verbunden, während das somatische Blatt dem Oberflächenektoderm anliegt. Die späteren Myokardzellen liegen im splanchnischen Mesoderm. Das somatische Mesoderm hingegen liefert Zellen für das Mesothel der Perikardhöhle (Männer, 2006). Innerhalb der Herzfelder unterscheidet man die lateral gelegenen primären Herzfelder und die sich medial dieser Areale befindlichen sekundären Herzfelder (Abb. 1).

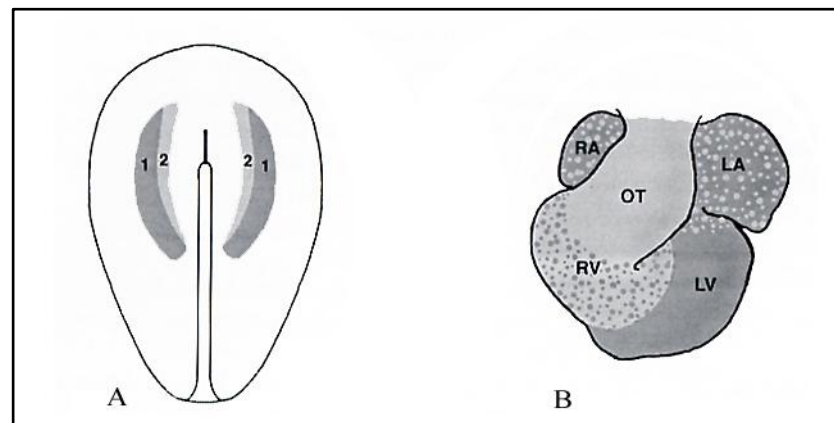


Abb. 1. Schematische Darstellung der Herzfelder und (A) deren Beitrag zu den Anteilen des „postlooping“-Herzschlauchs (B); (A) Hühnerembryo im HH-Stadium 5; (B) Hühnerherz im HH-Stadium 26. In B) sind die beiden genetisch unterschiedlichen myokardialen Zelllinien abgebildet: (1, dunkelgrau) Die primären Herzfelder liefern hauptsächlich das Material für den linken Ventrikel und die Vorhöfe (B). (2, hellgrau) Die sekundären Herzfelder liefern hauptsächlich das Material der Ausflussbahn und den rechten Ventrikel (B); RA, rechter Vorhof; LA, linker Vorhof; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; OT, Ausflussbahn; modifiziert nach Männer, 2006.

2.2. Rolle von Endoderm, Neuroektoderm und Chorda dorsalis in der Entwicklung der Herzfelder

Die Spezifizierung des myokardialen Schicksals der embryonalen Zellen beginnt während der frühen Gastrulation eventuell sogar schon im Verlauf der Primitivstreifenbildung. Elementare Schritte des *Commitments* (Spezifizierung und Determination) und der Differenzierung der myokardialen Zellen finden jedoch innerhalb der Herzfelder statt.

Die Bildung myokardialer Zellen innerhalb der Herzfelder ist von Interaktionen mit umgebenden nicht-myokardialen Geweben abhängig (Mangold, 1954; Chuang und Tseng, 1957; Jacobson, 1960). Das unter den Herzfeldern liegende Endoderm sezerniert Myokard induzierende Signale. Die Neuralplatte und die Chorda dorsalis hingegen üben einen hemmenden Einfluss auf die myokardiale Differenzierung aus (Jacobson, 1960, 1961; Goldstein und Fishman, 1998).

Für die induzierenden und hemmenden Einflüsse konnten verschiedene Signalfaktoren verantwortlich gemacht werden. Hierzu zählen Mitglieder der Wnt-Familie, *Bone morphogenetic protein*-Signalfaktoren (Bmp) und Faktoren der *Fibroblast growth factor*-Familie (Fgf).

Mitglieder der Wnt-Familie sowie Wnt-Antagonisten (Dkk-1 und Crescent) sind für die frühe Spezifizierung und Determination der Myokardzellen entscheidend. Ihre Funktion liegt in der Grenzziehung zwischen nicht-myokardiogenem und myokardiogenem Gewebe. Im Hühnerembryo wird in der kranialen Hälfte des Seitenplattenmesoderms durch die Wnt-Antagonisten Dkk-1 und Crescent, die im darunter liegenden Endoderm exprimiert werden, ein myokardiales Schicksal induziert. In der kaudalen Hälfte und im paraxialen Mesoderm hingegen wird die Myokardinduktion unterdrückt, indem im kaudalen Mesoderm und im Neuralrohr repressorisch wirkende Wnt-Faktoren wie Wnt-3a und Wnt-8c gebildet werden (Abb. 2). Im Gegensatz zu den Faktoren Wnt-3a und Wnt-8c, die über den kanonischen Wnt-Signalweg die Myokardbildung inhibieren, soll sich Wnt-11 über einen nicht-kanonischen Wnt-Signalweg an der Induktion des Myokards beteiligen (Pandur et al., 2002; Solloway und Harvey, 2003). Wnt-11 wird sowohl im Mesoderm als auch im Endoderm exprimiert (Marlow et al., 2002).

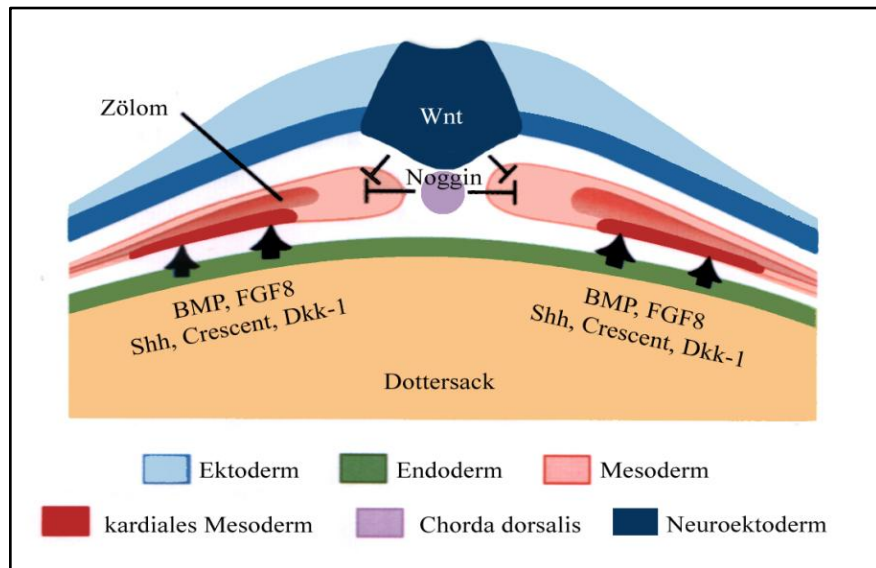


Abb. 2. Schematische Darstellung der Myokard induzierenden und hemmenden Faktoren; modifiziert nach Kirby, 2007.

Das mit dem anterioren Seitenplattenmesoderm verbundene Endoderm sezerniert unter anderem die Faktoren Fgf-8, Bmp2, Aktivin und den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 2 (Lough und Sugi, 2000). Es besteht eine zeitliche und räumliche Beziehung zwischen der Expression von Bmps und der Etablierung der primären Herzfelder, wie von Schultheiss et al. (1997) und Andree et al. (1998) im Hühnerembryo nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte durch die ektope Applikation des Bmp-Antagonisten Noggin im Bereich des Mesoderms der primären Herzfelder die Myokardiogenese unterdrückt werden. Die Bmp-Signale allein sind jedoch nicht ausreichend für die Induktion der myokardialen Differenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass dafür eine Kombination aus Bmp- und Fgf-Signalen notwendig ist (Lough et al., 1996; Barron et al., 2000; Alsan und Schultheiss, 2002).

2.3. Etablierung der schlauchförmigen Herzanlage

Im weiteren Verlauf der Myokardentwicklung bildet sich im HH-Stadium 7 durch die Verschmelzung der rechts- und linksseitigen Herzfelder oberhalb der vorderen Darmforte eine halbmondförmige Spange (*Cardiac crescent*). Die Herzfelder vereinigen sich in der Körpermitte ventral des Vorderdarms, so dass in kraniokaudaler Achse ein kurzer primitiver Herzschlauch entsteht (Abb. 3). Diese Struktur stellt den

primitiven rechten Ventrikel dar (bei Mausembryonen den linken Ventrikel), an den später kranial und kaudal weitere kardiale Abschnitte angefügt werden.

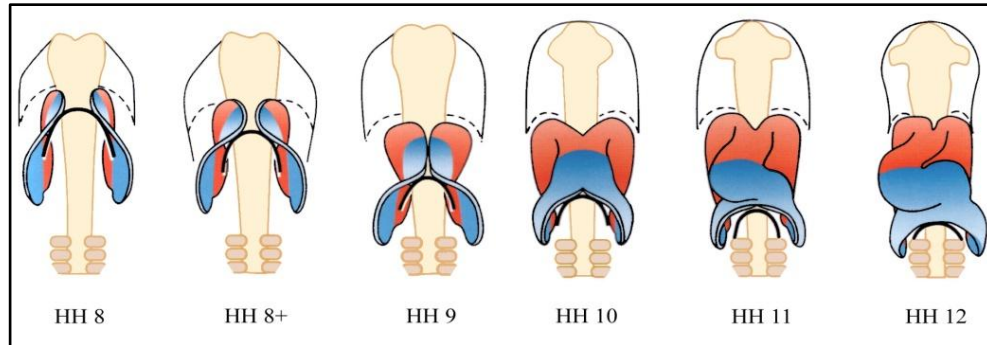


Abb. 3. Bildung des primitiven Herzschlauchs aus dem kardialen Mesenchym. Rot stellt die Ausflussregion (rechter Ventrikel und Konus), blau stellt die Einflussregion (Atrien, atrioventrikulärer Kanal, linker Ventrikel) des Herzschlauchs dar; modifiziert nach Kirby, 2007.

Die primären Herzfelder liefern Zellen für die Verlängerung des Herzschlauchs im kaudalen Bereich (atrioventrikulärer Kanal, Vorhöfe), während die sekundären Herzfelder Zellen für die Angliederung der kranialen Strukturen wie der Ausflussbahn und des größten Teils des rechten Ventrikels bereitstellen (für Review siehe Männer, 2006).

2.4. Umwandlung des geraden Herzschlauchs in die Herzschleife

Im weiteren Verlauf der Herzentwicklung beginnt ab dem HH-Stadium 9/10 die Umwandlung des geraden Herzschlauchs in eine Herzschleife; das Herz erhält eine morphologische Rechts/Links-Asymmetrie. Dieser Prozess wird als *Cardiac looping* bezeichnet (Abb. 4).

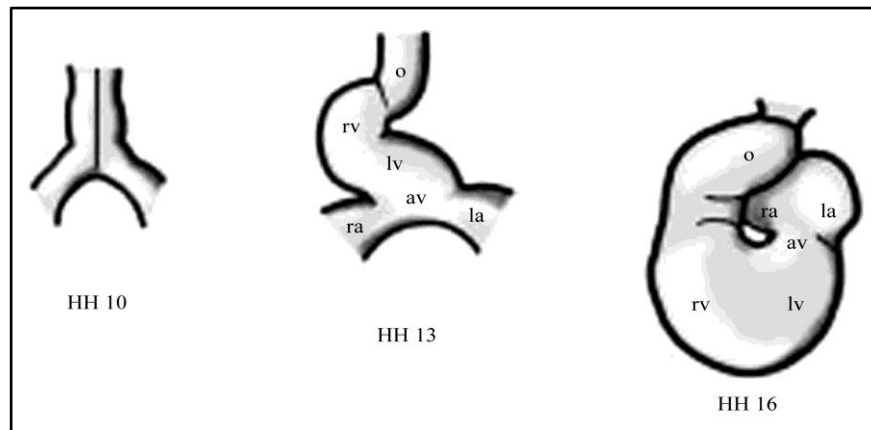


Abb. 4. Schematische Darstellung der Umwandlung des geraden Herzschauchs in die Herzschleife. ra, rechter Vorhof; la, linker Vorhof; rv, rechter Ventrikel; lv, linker Ventrikel; av, atrioventrikulärer Kanal; o, Ausflussbahn; modifiziert nach Männer, 2004.

Das *Cardiac looping* führt zur ersten gestaltlichen Rechts/Links-Asymmetrie der inneren Organe. Der erste die Rechts/Links-Achse definierende und Asymmetrie erzeugende Schritt findet jedoch schon wesentlich früher statt und kann molekularbiologisch anhand von spezifischen Markern nachgewiesen werden. Bereits während der Gastrulation im HH-Stadium 3 formiert sich die Rechts/Links-Achse. Innerhalb des Hensenschen Knotens spielen antagonistische Interaktionen zwischen *Sonic hedgehog* (Shh) und Bmp4 eine wichtige Rolle in der Bildung von asymmetrischen Signalzentren, die letztendlich für die Lateralisierung des Seitenplattenmesoderms verantwortlich sind. Shh induziert Nodal auf der linken Seite des Hensenschen Knotens, was wiederum die Expression von Lefty in der Mittellinie auslöst (Abb. 5). Lefty reguliert die Nodal-Expression und verhindert so ein Übertreten von „linksseitigen“ Signalen auf die rechte Seite. Nodal wird zusätzlich im linken Seitenplattenmesoderm induziert und fördert dort die Expression weiterer „linksseitiger“ Gene wie Pitx2 und Nkx3.2 (Schneider et al., 1999). Eine asymmetrische Expression von Fgf-8 und Bmp4 im Hensenschen Knoten hemmt über den Faktor *Chick snail related* (cSnR) die Anschaltung des linksseitigen genetischen Programms auf der rechten Seite (Levin et al., 1995; Monsoro-Burq und Le Douarin, 2001).

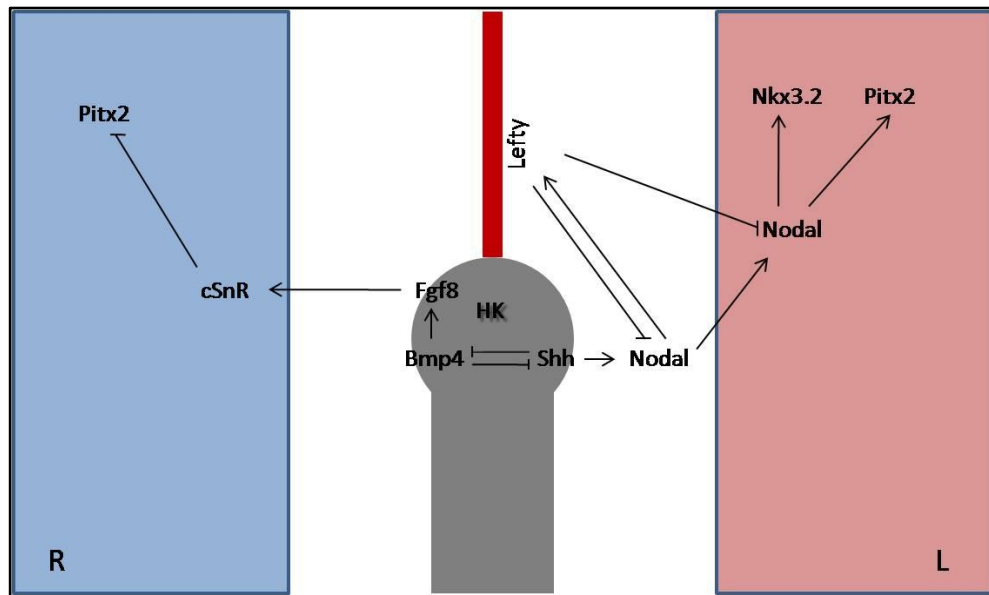


Abb. 5. Schematische Darstellung der Rechts/Links-Signalkaskaden (blau bzw. rot, rechtes bzw. linkes Seitenplattenmesoderm; grau, Primitivstreifen mit HK, Hensenscher Knoten; rot, embryonale Mittellinie; modifiziert nach Brand, 2003).

Als Ende des Loopingprozesses wird der Zeitpunkt gesehen, an dem die einzelnen Abschnitte des Herzschlauchs annähernd die dem reifen Herzen entsprechenden topographischen Beziehungen zueinander eingenommen haben. Während sich zum Beispiel vor dem *Cardiac looping* die zukünftigen Ventrikel kranial der Atrien befinden, liegen die Ventrikel am Ende des Prozesses in ihrer definitiven Position kaudal der Atrien (Abb. 4).

2.5. Rekrutierung primär extrakardialer Vorläuferzellen

Der primitive embryonale Herzschlauch besteht lediglich aus zwei verschiedenen Zelltypen: dem die äußere Wand bildenden primitiven Myokard und dem innen liegenden Endokard. Dazwischen befindet sich eine zellfreie Schicht extrazellulärer Matrix, die als *Cardiac jelly* bezeichnet wird (Davis, 1924). Das reife Herz besitzt eine größere Komplexität und verfügt über zusätzliche Komponenten wie Epikard, Subepikard, Koronargefäßsystem, Nervengeflechte, Bindegewebe und Herzklappen. Die Zellen für diese Komponenten stammen zum Teil aus primär extrakardialen Zellpopulationen wie der kardialen Neuralleiste und dem Proepikard. Im Bereich der

Ausflussbahn gehen beispielsweise in späteren Stadien der Herzentwicklung Myokardzellen durch Apoptose verloren. Diese werden durch glatte Muskelzellen ersetzt, die zum Großteil aus der kardialen Neuralleiste stammen (für Review siehe Hutson und Kirby, 2003). Kardiale Neuralleistenzellen bilden weiterhin das Septum aorticopulmonale, das den Saccus aorticus und die kardiale Ausflussbahn in die systemischen und pulmonalen Strombahnen unterteilt.

2.5.1. Das Proepikard

Mehr als ein Jahrhundert lang ging man davon aus, dass sowohl das Epikard, welches das reife Herz als äußere Schicht zur flüssigkeitsgefüllten Perikardhöhle abgrenzt, als auch das Myokard vom primitiven embryonalen Myokard gebildet werden. Letzteres wurde daher auch als „Myoepikard“ bezeichnet (Mollier, 1906). Kurkiewicz fand bereits 1909, dass die Vorläuferzellen für das Epikard aus einer primär extrakardialen Quelle stammen, jedoch blieben seine Befunde annähernd 60 Jahre lang unbeachtet. Diese Zellpopulation erhielt später die Bezeichnung „proepikardiale Serosa“ (PrES) oder „Proepikard“ (Viragh und Challice, 1981; Viragh et al., 1993; Männer, 1999; Männer et al., 2001).

Das Proepikard wurde bereits in Embryonen verschiedener Wirbeltierarten wie der Maus (Viragh und Challice, 1981; Komiyama et al., 1987; Kálmán et al., 1995), der *Tupaia* (Kuhn und Liebherr, 1988) und dem Menschen (Hirakow, 1992) beschrieben. Im Säugerembryo entwickelt sich das Proepikard als eine Ansammlung von mesothelialen Zellaggregaten im Bereich der ventrokaudalen Wand des Septum transversum (Viragh und Challice, 1981).

Im Hühnerembryo bildet sich das Proepikard zu Beginn des 3. Bebrütungstages in Form einer blumenkohlartigen Ansammlung von Zotten. Das Proepikard besteht aus Mesothel- und Mesenchymzellen, die sich am Boden der Perikardhöhle im Bereich des venösen Pols kranial der Leberanlage hervorwölben (Männer, 1992).

2.5.2. Proepikardiale Markergene

Es wurden bereits mehrere Transkriptionsfaktoren entdeckt, die eine intensive Expression im Proepikard aufweisen und somit als proepikardiale Markergene geeignet sind. Dazu zählen der T-Box-Faktor Tbx18, das Wilms-Tumor-Suppressor-Protein 1 (Wt1), der Transkriptionsfaktor Epicardin (auch Capsulin oder POD1 genannt) und der Kompetenzfaktor CFC.

Besonders auffällig ist sowohl im Hühner- als auch im Mausembryo die Expression des T-Box-Faktors Tbx18 (Haenig und Kispert, 2004; Kraus et al., 2001). Die T-Box ist eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne innerhalb der bekannten Mitglieder der T-Box-Genfamilie. Die funktionelle Rolle von Tbx18 in der proepikardialen Entwicklung ist bislang ungeklärt. Neben der deutlichen Expression im Proepikard und dessen Derivaten konnte Tbx18 auch in der Genitalleiste, in den Extremitätenknospen und der anterioren Hälfte der Somiten nachgewiesen werden (Haenig und Kispert, 2004). Die Untersuchung von Tbx18-defizienten Mausmutanten brachte jedoch keine Hinweise darauf, dass der Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Induktion des Proepikards oder der Bildung des Epikards spielt (Bussen et al., 2004). Diese Tiere entwickeln keine Sinushörner aus perikardialem Mesenchym und weisen Defekte der Hohlvenen auf, während die Bildung der Pulmonalvene und der Vorhöfe durch die Tbx18-Mutation nicht beeinträchtigt ist (Christoffels et al., 2006).

Der Transkriptionsfaktor Wt1 ist ein weiteres Protein, dessen Expression deutlich im Proepikard nachweisbar ist. Wt1 ist das Genprodukt eines Tumor-Suppressor-Gens, bei dessen Inaktivierung durch Mutation beim Menschen bösartige Tumore in der Niere entstehen (Scholz und Kirschner, 2005). Der Transkriptionsfaktor, der über mehrere Zinkfinger-DNA-Bindedomänen verfügt, spielt eine wichtige Rolle in der Bildung der Gonaden und der Niere, aber auch in der Entstehung verschiedener mesothelialer Gewebe. Das zeigen homozygote Wt1-Mausmutanten, die zwischen ED 12 und dem Ende der embryonalen Entwicklung sterben. Diese Embryonen verfügen über keine Gonaden und Nieren und es treten schwere Störungen der Milz und des Herzens auf; die Epikardbildung ist stark beeinträchtigt (Kreidberg et al., 1993; Moore et al., 1999; Herzer et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Wt1 die Transkription des Zelladhäsionsmolekülgens α -4-Integrin aktiviert (Kirschner et al., 2006). Die kardiale Expression von α -4-Integrin wird durch eine Wt1-Deletion signifikant reduziert,

wodurch die Zelladhäsion zwischen Epikard und Myokard gestört wird. Es besteht demnach u. a. ein enger funktioneller Zusammenhang zwischen der Wt1-Expression und der normalen Epikardentwicklung. Es liegen jedoch keine Informationen über die Auswirkungen der Wt1-Deletion auf die Proepikardentwicklung vor. Die Fehlbildungen des Herzens äußern sich weiterhin in einer gestörten Koronargefäßbildung und in einem auffallend dünnen Myokard, wie es auch in RXR α -(Retinsäurerezeptor)-defizienten Mäusen beobachtet wurde (Sucov et al., 1994; Dyson et al., 1995). Die Vermutung liegt daher nahe, dass der Transkriptionsfaktor Wt1 auch an der Kontrolle der Retinsäure-Signalwege im Epikard beteiligt ist (Männer et al., 2001). Wt1 spielt außerdem eine wichtige Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition, bei der sich epikardiale Zellen zu Mesenchymzellen umwandeln (siehe 2.5.4.1; Moore et al., 1999).

2.5.3. Entwicklung des Proepikards und Arten des Transfers der Vorläuferzellen zum Herzen

Beim Hundshai (*Scyliorhinus caniculus*) aus der Klasse der Knorpelfische (Chondrichthyes) entsteht das Proepikard wie bei Säugerembryonen (Maus, Ratte, Tupaia) kranial der Leberanlage im Bereich des Septum transversum nahe dem venösen Pol des Herzens (Muñoz-Chapuli et al., 1997). Bei Amphibien wurde das Proepikard bisher lediglich im Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) beschrieben (Fransen und Lemanski, 1990). Auch hier entsteht es im Bereich des Septum transversum. Weitere Informationen über die Lage oder morphologische Beschaffenheit der proepikardialen Anlage bei den Amphibien wurden anhand dieser Untersuchungen jedoch nicht geliefert.

In Hühner- und Wachtelembrionen wurde das Proepikard wiederholt beschrieben (Ho und Shimada, 1978; Shimada und Ho, 1980; Hiruma und Hirakow, 1989; Männer, 1992; Viragh et al., 1993). Männer (1992) untersuchte die Entwicklung der proepikardialen Zotten und ihren Transfer auf die Oberfläche des Herzschlauchs im Hühnerembryo mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie. Dabei wurden im HH-Stadium 14 im Bereich des perikardialen Mesothels, das die ventrale Wand des Sinus venosus bedeckt, erstmals kleine mesotheliale Aufwölbungen sichtbar, die in den folgenden Entwicklungsstadien zu einer blumenkohlartigen Ansammlung mesothelialer Zellen auswachsen (Abb. 6A). Diese perikardialen Zotten nehmen Kontakt zur dorsalen

Wand der Herzschleife auf und bilden dort eine feste Gewebebrücke aus, die auch als sekundäres dorsales Mesokard bezeichnet wird (Abb. 6C; Männer et al., 2001). Die Ausbreitung der Zellen als primitives Epithel auf der Oberfläche des Herzens wurde eingehend analysiert (Ho und Shimada, 1978; Shimada und Ho, 1980; Hiruma und Hirakow, 1989; Männer, 1992; Viragh et al., 1993).

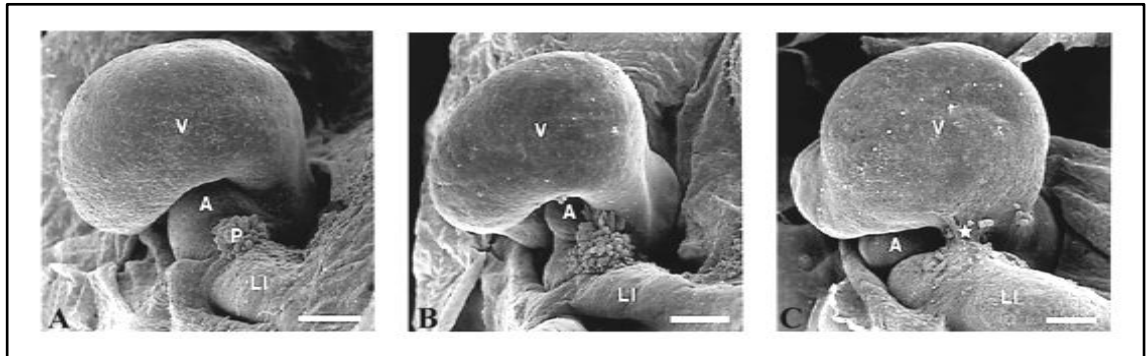


Abb. 6. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Etablierung der sekundären Gewebebrücke (markiert mit Sternchen) im Hühnerembryo; (A) Proepikard im HH-Stadium 16; (B) proepikardiale Zotten nehmen Kontakt zum dorsalen ventrikulären Myokard auf; (C) Transfer der Vorläuferzellen auf die Herzschleife über die sekundäre Gewebebrücke und Ausbreitung des primitiven Epikards (gepunktete Linie); V, Ventrikel; A, primitives Atrium; P, Proepikard; LI, Leber; Maßstabsbalken = 200 μ m; modifiziert nach Männer et al., 2001.

Während der Transfer der Vorläuferzellen im Vogelembryo überwiegend über die oben genannte sekundäre Gewebebrücke erfolgt, gibt es bei den Säugerembryonen und einigen Fischembryonen einen anderen Übertragungsmechanismus. Die blasenförmigen Ausstülpungen der voll ausgebildeten Proepikardanlage bestehen aus abgeflachten Mesothelzellen und enthalten Mesenchymzellen sowie viel extrazelluläre Matrix (Viragh und Challice, 1981; Komiyama et al., 1987; Kuhn und Liebherr, 1988; Hirakow, 1992). Die mesothelialen Zellen schnüren sich in kleinen Gruppen ab und schweben als Vesikel durch die flüssigkeitsgefüllte Perikardhöhle, bis sie an der nackten Oberfläche des Myokards haften bleiben. Dort flachen sich die Zellaggregate ab und breiten sich als primitives Epikard auf der Herzoberfläche aus. In Amphibienembryonen wurde ebenfalls die Ausbildung einer sekundären Gewebebrücke nachgewiesen. Zusätzlich fand man aber auch frei schwebende Zellaggregate (Fransen und Lemanski, 1990). Es ist anzunehmen, dass in diesem Fall beide Arten des Zelltransfers genutzt werden.

2.5.4. Derivate des Proepikards

Im Anschluss an die Bildung des primitiven Epikards bildet sich unter ihm eine zellfreie Schicht extrazellulärer Matrix, das Subepikard. Durch epithelial-mesenchymale Transition von Epikardzellen entstehen Mesenchymzellen, die zunächst das Subepikard und im Anschluss daran die myokardialen und subendokardialen Schichten der Herzwand besiedeln. Diese Zellen differenzieren sich zu Fibroblasten, sowie Endothel- und glatten Muskelzellen des koronaren Blutgefäßsystems. Es konnte ausgeschlossen werden, dass sich die proepikardialen Vorläuferzellen zu Herzmuskelzellen differenzieren (Mikawa und Gourdie, 1996; Gittenberger-de Groot et al., 1998; Männer, 1999). Die Entwicklung der verschiedenen proepikardialen Derivate soll in den folgenden Abschnitten noch eingehender beschrieben werden.

2.5.4.1. Epikard

Die Anheftung von proepikardialen Zotten und frei schwebenden proepikardialen Vesikeln, sowie die Adhäsion des primitiven Epikards an das Myokard werden u. a. durch Interaktionen zwischen $\alpha 4$ -Integrinen, die im Proepikard und Epikard exprimiert werden, und dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), das im Myokard gebildet wird, verursacht (Kwee et al., 1995; Yang et al., 1995). In Mausembryonen, in denen die Gene für $\alpha 4$ -Integrine oder VCAM-1 ausgeschaltet wurden, sind die initiierten Schritte der Epikardentwicklung im Zeitraum von ED 9.5 bis ED 11 nur gering gestört, was sich in einer verringerten Anzahl an proepikardialen Zellaggregaten äußert. Aufgrund der nicht vorhandenen Adhäsionsmoleküle fehlt bei Embryonen an ED 11.5 das Epikard.

Ausgehend von der Kontaktstelle der sekundären Gewebebrücke findet die Ausbreitung der epikardialen Zellen zunächst über die dorsalen Oberflächen der Ventrikel, Atrien und der Ausflussbahn statt. Darauf folgend überziehen die Epikardzellen die lateralen und ventralen Flächen der Ventrikel der atrioventrikulären und konotrunkalen Furche (Männer et al., 2001). Im letzten Schritt werden die ventralen Seiten der Atrien und der Ausflussbahn besiedelt (für Review siehe Männer et al., 2001). Im distalen Abschnitt der Ausflussbahn (Truncus arteriosus) stammen die Epikardzellen jedoch nicht vom

Proepikard, sondern von Zellen des perikardialen Mesothels am Übergang von der Ausflussbahn in die dorsale Wand der Perikardhöhle (Männer, 1999).

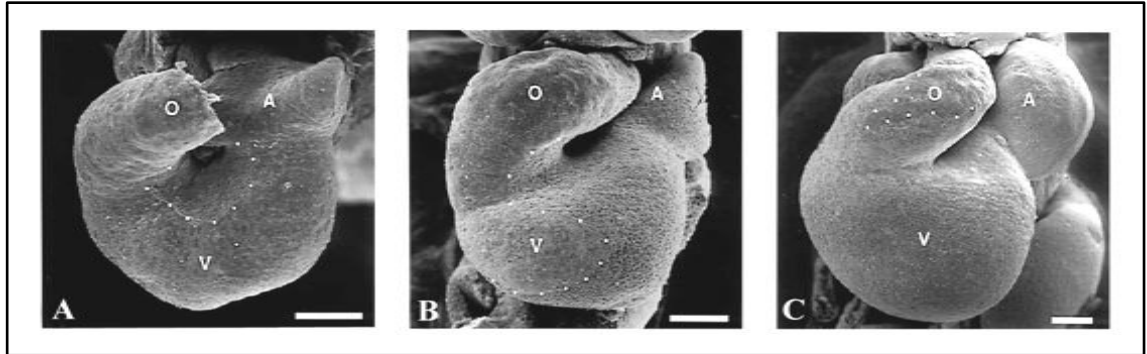


Abb. 7. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Ausbreitungsgrenze des primitiven Epikards (gepunktete Linie) im Hühnerembryo im (A) HH-Stadium 19; (B) HH-Stadium 21 und (C) HH-Stadium 24; V, Ventrikel; A, primitives Atrium; O, Ausflussbahn; Maßstabsbalken = 200 μm ; modifiziert nach Männer et al., 2001.

2.5.4.2. Bildung von Subepikard und epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Das Subepikard findet sich zuerst im Bereich der atrioventrikulären, konovertrikulären und interventrikulären Furchen, von wo es sich über die Ventrikel und die ventralen Flächen der Atrien ausbreitet (Pérez-Pomares et al., 1997). Seine extrazelluläre Matrix enthält u. a. Fibronektin, Kollagen I, IV, V, IV (Tidball, 1992; Hurlé et al., 1994; Kálmán et al., 1995; Bouchey et al., 1996; Kim et al., 1999), Proteoglykane und Laminin (Kálmán et al., 1995).

Das ursprünglich zellfreie Subepikard wird von Mesenchymzellen besiedelt, die durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) aus dem primitiven Epikard hervorgehen (Icardo et al., 1990; Viragh et al., 1990, 1993; Muñoz-Chapuli et al., 1994, 1996; Markwald et al., 1996; Pérez-Pomares et al., 1997, 1998a; Dettman et al., 1998; Vrancken-Peters et al., 1999). Die Bildung von mesenchymalen Zellen aus Epithelzellen ist ein elementarer Prozess im Laufe der Embryonalentwicklung. Obwohl die Einzelheiten der Induktion und Regulation noch nicht vollständig verstanden sind, belegen neuere Daten, dass Fgf-1, Fgf-2, *Vascular endothelial growth factor* (VEGF),

Transforming growth factor (TGF β) und *Epithelial growth factor* (EGF) eine Rolle in der Stimulation der epikardialen EMT spielen (Morabito et al., 2001; Winter und Gittenberger-de Groot, 2007).

2.5.4.3. Koronargefäßsystem

Bis in die 1980er Jahre wurde angenommen, dass das koronare Blutgefäßsystem aus drei Quellen stammt: (1) einem primitiven kapillaren Gefäßplexus, der durch Vaskulogenese (*de novo*-Bildung von Blutgefäßen) im subepikardialen Mesenchym entsteht; (2) aus den intratrabekularen Räumen (Sinusoiden) der embryonalen Ventrikel; und (3) aus endothelialen Gefäßsprossen (Angiogenese), die von der Aorta (spätere Koronararterienstämme) bzw. dem Sinus venosus (Stamm der späteren Herzvenen) auswachsen und sich mit dem kapillären Gefäßplexus verbinden.

Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass das gesamte koronare Blutgefäßsystem letztlich aus einer Quelle, nämlich dem Proepikard stammt (Mikawa und Fishman, 1992; Mikawa und Gourdie, 1993; Poelmann et al., 1993; Dettman et al., 1998; Männer, 1999, 2000). Endotheliale Vorläuferzellen, die Angioblasten, wandern nach der epithelial-mesenchymalen Transition vom Epikard ein. Blutinseln, die aus primitiven Endothelzellen und roten Blutzellen bestehen, treten vermehrt auf. Es bildet sich im Subepikard und Myokard durch Vaskulogenese ein endothelialer Gefäßplexus. Diese Initialphase der Koronargefäßbildung erfolgt ohne Blutfluss. Die Sauerstoffarmut induziert im Epikard und im darunterliegenden Myokard die Expression von Gefäßendothel induzierendem VEGF (Ferrara et al., 1996). Vom primitiven koronaren Gefäßplexus ausgehend wachsen endotheliale Gefäßsprossen zunächst in den Sinus venosus und später in die Aorta ein, wodurch das koronare Blutgefäßsystem in das Blutkreislaufsystem integriert wird (Tomanek et al., 1996; Majesky, 2004). Durch die einsetzende Durchströmung mit Blut beginnt dann das Gefäß-*Remodeling*. Hier werden die bestehenden Strukturen durch Angiogenese umgewandelt, so dass neue Gefäße aussprossen und arterielle, venöse und kapilläre Strukturen gebildet werden.

Es gibt eine weitere strukturelle Komponente des reifen Herzens, deren embryonale Entwicklung bislang aufgrund fehlender Marker nicht ausreichend untersucht werden konnte: das kardiale Lymphgefäßsystem. Da sich die koronaren Lymphgefäße in

unmittelbarer Nähe zu den koronaren Blutgefäßen befinden, ist zu vermuten, dass beide Gefäßarten aus derselben Quelle, nämlich dem Proepikard, stammen.

2.5.4.4. Allgemeine Lymphgefäßentwicklung

Die Herkunft der Lymphgefäße wird kontrovers diskutiert. Sabin (1909) entwickelte die weit verbreitete Theorie, dass die Lymphgefäße von den Venen abstammen. Die Lymphsäcke sprossen aus den Endothelzellen von tiefen embryonalen Venen, wachsen davon ausgehend zu Lymphgefäßen heran und verzweigen sich innerhalb der Organe, was einer angiogenetischen Gefäßbildung entspricht. Kampmeier (1912) hingegen vertrat die Hypothese, dass die Lymphgefäße durch Vaskulogenese entstehen. Untersuchungen an Wachtel/Huhn-Chimären haben in der Tat gezeigt, dass die Lymphsäcke nicht die alleinige Quelle der Lymphgefäße sind. Es treten bereits Lymphangioblasten im Mesoderm der Extremitätenknospen und der Allantois auf, bevor sich die Lymphsäcke bilden (Schneider et al., 1999; Wilting et al., 2000; Papoutsis et al., 2001, Rodriguez-Niedenführ et al., 2001).

2.5.4.5. Das koronare Lymphgefäßsystem

Anhand von Injektionsversuchen mit Latex (Rychter et al., 1971) und Semi-Dünnschnitten aus solchen Experimenten (Klika et al., 1972) konnte gezeigt werden, dass die ersten Lymphgefäße des Herzens zwischen dem 8. und 9. Bebrütungstag im Hühnerembryo im Bereich der Gefäßstämme erscheinen. Von dort breiten sie sich über die Oberfläche der großen arteriellen Gefäßstämme zur ventralen Kammerbasis des Herzens aus (Abb. 6). Die Entwicklung schreitet weiter voran, bis am Ende des 10. Tages die dorsale Wand des Herzens und der ventrale Bereich der Herzspitze erreicht werden und am 11. Tag die ersten Lymphkapillaren auftreten. Die Entwicklung von Lymphklappen beginnt am 14. Bebrütungstag im Bereich der größeren Lymphgefäße.

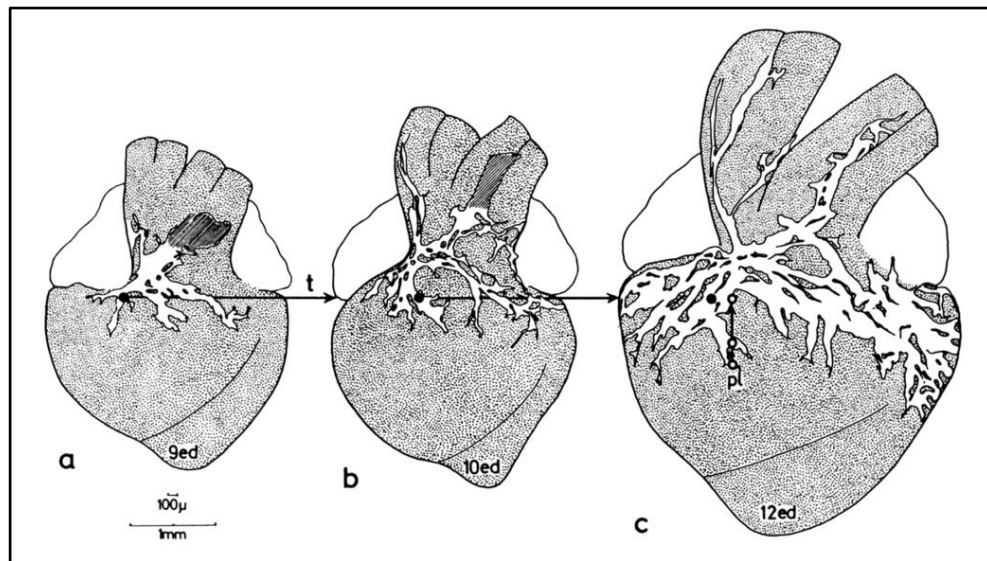


Abb. 8. Durch Injektionsversuche mit Latex wird die Ausbreitung des koronaren Lymphgefäßsystems im embryonalen Hühnerherzen dargestellt. Die schwarzen Punkte markieren denselben Bereich innerhalb der Herzen unterschiedlichen Alters; die weißen Punkte im rechten Herz markieren die basoapikale Ausbreitung innerhalb von Embryonen desselben Alters; nach Klika et al., 1972.

Darstellungen der (Lymph-)Gefäßentwicklung mittels Injektion von Latex (Rychter et al., 1971; Klika et al., 1972) weisen einige methodische Mängel auf. Neben einer flächigen Artefaktbildung im Applikationsbereich des Farbstoffs, die durch den hohen Druck der Latexeinspritzung hervorgerufen wird, können mit Injektionstechniken nur bereits miteinander verbundene Gefäße dargestellt werden. Durch Vaskulogenese gebildete Gefäßinseln können mit Injektionstechniken nicht dargestellt werden.

Ein entscheidender methodischer Fortschritt für die Erforschung der Lymphangiogenese war die Entdeckung verschiedener molekularer Marker für Lymphendothelzellen. Ein geeigneter Marker für Lymphendothelien ist Prox1 (Rodriguez-Niedenführ et al., 2001; Wilting et al., 2002). Hierbei handelt es sich um einen Homeobox-Transkriptionsfaktor, der die Kerne von Lymphendothelzellen anfärbt, während die Endothelzellen von Blutgefäßen nicht markiert werden. Prox1 ist das Homolog zum *Drosophila*-Homeoboxgen *Prospero*, das u. a. in der Augenentwicklung eine Rolle spielt (Oliver et al., 1993; Tomarev et al., 1996, 1998; Wigle und Oliver, 1999). Prox1 wird im Gegensatz zu anderen lymphspezifischen Markern auch noch im adulten Gewebe exprimiert. Des Weiteren spielt Prox1 eine funktionelle Rolle in verschiedenen Geweben, die ihren Ursprung in allen drei Keimblättern haben, und wird somit in der

Linse, dem Myokard, der Leber, dem Pankreas und dem zentralen Nervensystem nachgewiesen. Prox1-defiziente Mausembryonen zeigen einen auffälligen Phänotyp. Sie entwickeln ein normales Blutgefäßsystem, während die Lymphangiogenese bereits in den frühen Entwicklungsstadien schwer gestört ist, wodurch die Embryonen im Verlauf der Embryogenese sterben (Wigle und Oliver, 1999). Diese Befunde belegen, dass Prox1 ein wichtiger spezifischer Regulator der Lymphentwicklung ist und dass die Entstehung des Lymph- und des Blutgefäßsystems voneinander unabhängig ist.

Andere Lymphendothelmarker sind der Hyaluronrezeptor Lyve-1 (Banjeri et al., 1999) und Podoplanin (Breiteneder-Geleff et al., 1999). In murinen Embryonen sind die frühen lymphatischen Anlagen, die Lymphsäcke, Lyve-1-positiv (Wigle et al., 2002; Buttler et al., 2006). Das Mukoprotein Podoplanin wird in Podozyten und im lymphatischen Endothel exprimiert (Breiteneder-Geleff et al., 1999), sein Einsatz als geeigneter Lymphendothelmarker in embryonalen Geweben wurde allerdings noch nicht weiter getestet.

2.6. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Induktion und Differenzierung des Proepikards im Hühnerembryo. Die Entwicklung vieler Organanlagen wird durch benachbarte Organe oder Gewebe induziert. Für die Untersuchung der Induktion des Proepikards ist es daher zunächst wichtig, genaue Informationen über die bisher nur unzureichend geklärte räumliche Entwicklung der Proepikardanlagen zu gewinnen. Befunde beim Hundshai- und Hühnerembryo deuten darauf hin, dass es sich beim Proepikard primär um eine paarige Struktur handeln könnte. Es gibt weiterhin Anzeichen, dass sich diese paarige Struktur im Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen Muster bildet und letztendlich nur die rechte proepikardiale Anlage zum vollen Phänotyp heranreift. Das Ziel der ersten Teilstudie ist daher die Klärung der Frage, wie die Topogenese des Proepikards im Hühnerembryo verläuft. Um eine Grundlage für zukünftige Studien an Mausembryonen zu bekommen, wird der Prozess der Proepikardentwicklung auch im Mausembryo untersucht.

Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Teilstudie sollten dann erste experimentelle Studien durchgeführt werden. Sollte sich z. B. die Vermutung bestätigen, dass das

Proepikard in einem bilateral asymmetrischen Muster entsteht, wäre zu prüfen, ob diese Asymmetrie durch rechts/links-seitenspezifische Signale kontrolliert wird. Sollten sich besondere topographische Beziehungen zwischen dem Proepikard und benachbarten Geweben oder Organen zeigen, die auf eine mögliche induzierende oder hemmende Wirkung hindeuten, so wäre zu prüfen, ob diese Strukturen einen Einfluss auf die Proepikardentwicklung ausüben.

Eine bilateral asymmetrische Entwicklung des Proepikards wäre für die Identifizierung von Proepikard induzierenden oder inhibierenden Signalen von großem Vorteil. Sollte tatsächlich nur eine der beiden Proepikardanlagen den reifen Phänotyp bilden, während die andere Seite sich nicht weiterentwickelt, könnte man in einer dritten Teilstudie experimentelle Verfahren entwickeln, mit denen Kandidaten auf ihre mögliche Proepikard induzierende oder hemmende Wirkung getestet werden könnten. Vorstellbar sind Verfahren, bei denen Trägerperlen (*Beads*) mit Faktoren beladen werden, die eine asymmetrische Expression im Bereich des venösen Pols des embryonalen Herzens während der Phase der Proepikardentwicklung zeigen (Abb. 2).

Der vierte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Differenzierung des Proepikards und behandelt damit einen von den ersten drei Teilstudien unabhängigen Aspekt der Proepikardentwicklung. Es ist bekannt, dass das Proepikard sämtliche Zellen des koronaren Blutgefäßsystems sowie einen Großteil der kardialen Bindegewebszellen liefert. Offen blieb bisher, ob sich proepikardiale Vorläuferzellen auch noch zu weiteren Strukturen des reifen Herzens differenzieren. Ein Kandidat, dessen Herkunft bislang ungeklärt ist, ist das koronare Lymphgefäßsystem (siehe 2.5.4.5). Um eine Beteiligung des Proepikards an der Bildung der kardialen Lymphgefäße zu ermitteln, wurde das Proepikard von Wachtelembrionen homotop in Hühnerembryonen transplantiert und das Schicksal des Transplantats mittels Wachtelendothel und Lymphendothel spezifischen Markern analysiert.

Von den Ergebnissen meiner Studie erhoffe ich mir ein verbessertes Verständnis der Zusammenhänge, die zur Induktion und Differenzierung des Proepikards führen. Diese Ergebnisse könnten z.B. zu neuartigen Ansätzen (Neovaskularisierung) in der Therapie der Koronarinsuffizienz adulter Herzen führen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Verbrauchsmittel bei folgenden Firmen bezogen: Biochrom, Invitrogen, Omnilab, Roche, Roth, Sigma.

Falcon Cell Strainer, 100 µm/Yellow	BD Bioscience
AG 1-X2 Resin	BioRad
Filtertips	Biozym
Bacto-Agar	Difco
Federschere n. Vannas,	
Iridektomieschere n. Wecker	Geuder
FBS (dialysiert)	Gibco
NucleoSpin Extract [®] , 50 preps.,	
NucleoSpin Plasmid [®] , 50 preps.	Macherey-Nagel
QIAprep [®] Spin Minipreps	Qiagen, Hilden
Filterpapier, Scheren	Phywe, Göttingen
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt

3.1.2. Geräte, Computerprogramme

Eppendorf Concentrator 5301
Eppendorf Centrifuge 5810 R
Hereaus BIOFUGE fresco
MJ Research PTC-200
Eppendorf BioPhotometer
Thermolyne Vario-Mix (Schaukel)
Whatman Biometra OV 2
Scanner Epson Perfection 4990 Photo
Gel-Pro Analyzer[™], Vers. 4.0.00.5, Media Cybernetics, Inc.

Adobe® Photoshop® CS 2

3.1.3. Proteine, Wachstumsfaktoren und Antikörper

Anti-Prox1, polyklonaler Antikörper	Acris
Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper, HRP-konjugiert	Acris
Ziege-anti-Mausimmunglobuline Sekundärantikörper, HRP-konjugiert	DAKO
Anti-Kaninchenimmunglobuline Schwein	DAKO
PAP-Komplex (Schwein)	DAKO
QH-1 Antikörper	Developmental Studies Hybridoma Bank
Rekombinantes Bmp2 (Mensch)	R&D Systems

3.1.4. Enzyme, DNA-Marker

Restriktionsenzym <i>SacI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym <i>SalI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym <i>NotI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym <i>XmiI</i>	Fermentas
RNase A	Roche
Proteinase K	Roche
DNase I (RNase-frei)	Roche
T3 RNA-Polymerase	Roche
T7 RNA-Polymerase	Roche
SP6 RNA-Polymerase	Roche
Ribonuclease-Inhibitor	Sigma
TriDye 1 kb DNA-Marker	<i>New England Biolabs Inc.</i>
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker 3	Fermentas

3.1.5. Bakterienstämme und Vektoren

E. coli DH5 α *supE44*, Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*,
gyrA96, *thi-1*, *relA1* (GibcoBRL, Hanahan, 1983)

pSP72 Klonierungsvektor, 2,5 kb, Amp^R
pBluescript II KS+ Klonierungsvektor, 3,0 kb, Amp^R
pBluescript II SK- Klonierungsvektor, 3,0 kb, Amp^R
pBluescript SK- Klonierungsvektor, 3,0 kb, Amp^R

3.1.6. Zelllinien

Q2bn/hBmp2 Freundliche Gabe von Dr. D. Duprez (Duprez et al., 1996)
Q2bn/antisense hBmp2 Freundliche Gabe von Dr. D. Duprez (Duprez et al., 1996)
10T1/2 Kontrollzelllinie

3.1.7. Hühnerembryonen, Wachtelembryonen

Befruchtete Hühnereier (*White Leghorn*, *Gallus gallus*) wurden von der Fa. Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) und dem Tierversuchsgut Holtensen der Universität Göttingen, befruchtete Legewachteleier (*Coturnix coturnix*) von der Fa. Maak (Lübeck-Wulfsdorf) bezogen. Die Inkubation erfolgte im Flächenbrüter (Fa. Siepmann, Typ 400) bei einer Temperatur von 38 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75 %. Die Stadierung der Embryonen wurde anhand der Morphologie bezogenen Stadierungssysteme nach Hamburger und Hamilton (HH; 1951) durchgeführt.

3.1.8. Mausstamm

HsdWin:NMRI (Auszuchtstamm) Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln

3.1.9. Sonden für *Whole mount-in situ*-Hybridisierungen

Tab. 1: RNA-Sonden für *Whole mount-in situ*-Hybridisierungen

Bezeichnung	Details	Lineari- sierung antisense	RNA- Poly- merase
Tbx18 (2.0)	Maus, 2,0 kb <i>EcoRI</i> -Fragment (Kraus et al., 2001)	<i>HindIII</i>	T7
Wt1	Maus Wt1 (pKS::KTS BLII-T3), 1,5 kb <i>Sau3AI</i> -Fragment, plus exon5, minus KTS), pBluescript II KS+, freundliche Gabe von Prof. H. Scholz, Berlin	<i>EcoRI</i>	T7
Wt1	Maus Wt1 (pKS::KTS BLII-T7), 1,5 kb <i>Sau3AI</i> -Fragment, plus exon5, minus KTS), pBluescript II KS+, freundliche Gabe von Prof. H. Scholz, Berlin	<i>XbaI</i>	T3
Tbx18	Huhn (ChickEST database, ChEST861E19), pBluescript KS	<i>NotI</i>	T3
Wt1	Huhn, 1,3 kb, Kudo, T., Japan	<i>XbaI</i>	T7
c-Prox1	Huhn, 1880 bp, pBluescript II SK-, Tomarev, S.	<i>SacI</i>	T7
Bmp4 (460)	Maus (pSP72::Bmp4(460)), Hogan, B., Zülch, A., Nashville, USA	<i>XmI</i> (<i>AccI</i>)	T7
Bmp2	Maus, 1,2 kb, pBluescript II SK, Hogan, B., Andrejewski, N.	<i>XbaI</i>	T3
Bmp4 (252)	Maus (pSP72::Bmp4 (252)), Hogan, B., Zülch, A., Nashville, USA	<i>EcoRI</i>	SP6

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA

3.2.1.1. Mini-Präparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden die kommerziell erhältlichen Kits „NucleoSpin Plasmid[®]“ der Fa. Macherey-Nagel (Düren) bzw. „QIAprep[®] Spin Minipreps“ der Fa. Qiagen (Hilden) verwendet. Die DNA wurde mit 30-50 µl H₂O_{bidest} bzw. 10 mM Tris-Puffer, pH 7.6, eluiert.

3.2.1.2. Midi-Präparation

Um eine höhere Plasmidausbeute zu erzielen, wurden die plasmidtragenden *E. coli*-Stämme in Volumina von 25 ml LB-Medium unter Selektionsdruck in 300 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Die Isolierung erfolgte mit dem Kit „QIAprep[®]“ (Midi-/Maxipreps) der Fa. Qiagen (Hilden). Das DNA-Pellet wurde in 100 µl DEPC-H₂O bzw. 10 mM Tris-Puffer, pH 7.6, aufgenommen.

3.2.2. Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden 1 %ige Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 90-100 mVolt für 30-60 min in einer Elektrophoresekammer der Fa. Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH durchgeführt.

Zur Beschwerung der Nukleinsäure und Markierung der Lauffront wurden die Proben mit 0,2 Vol. DNA-Ladepuffer vermischt und dann aufgetragen. Die Größenbestimmung erfolgte durch den Vergleich mit den Standards „GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder“, „Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III Marker 3“ (Fermentas, St. Leon-Rot) bzw. „TriDye 1 kb DNA-Marker“ (*New England Biolabs*). Die Färbung mit Ethidiumbromid erfolgte durch direkte Zugabe der Substanz in das Agarosegel (Konz. 1:100.000 in 1 x TBE-/bzw. 1 x TAE-Puffer). Die Färbung der Nukleinsäuren wurde unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) in einer Gel-Dokumentationsanlage von Intas (EpiChem³ Darkroom; Dokumentationsprogramm: Gel-Pro Analyzer[™], Vers. 4.0.00.5, Media Cybernetics, Inc.) sichtbar gemacht, digital fotografiert und über einen Thermodrucker der Fa. Intas/Mitsubishi (P91D) ausgedruckt.

50 x TAE-Puffer (Stammlösung)

Tris-Base	60,55 g
Essigsäure	14,3 ml
EDTA	9,305 g
H ₂ O _{bidest}	ad 250 ml
pH-Wert auf 8.3 eingestellt	

10 x TBE-Puffer (Stammlösung)

Tri-Base	54 g
Borsäure	5,5 g
0,5 M EDTA	20 ml
H ₂ O _{bide} st	ad 1000 ml

pH-Wert auf 8.0 eingestellt

3.2.3. Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Um die RNA-Produkte der *In vitro*-Transkription elektrophoretisch aufzutrennen, wurden 1 µl-Aliquots der RNA-Sonden wie folgt behandelt:

RNA-Lösung	1 µl
Probenpuffer	9 µl

Die vermischten Ansätze wurden 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl OrangeG-Ladepuffer. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei 70-90 mVolt für 40-60 min durchgeführt.

RNA-Probenpuffer

10 x MOPS	100 µl
Formamid	500 µl
DEPC-H ₂ O	400 µl

OrangeG-Ladepuffer

20 % Ficoll
10 mM Tris-Base, pH 7.5
1 mg/ml OrangeG (Farbstoff)

3.2.4. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**3.2.4.1. Analytische Restriktion**

Um verschiedene DNA-Konstrukte zu charakterisieren, wurden analytische Restriktionen nach folgendem Schema durchgeführt:

DNA-Lösung	05-1,0 µg
10 x Restriktionspuffer	1 µl
Restriktionsenzym	2-5 U
H ₂ O _{bide} st	ad 10 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert und anschließend auf einem analytischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.4.2. Präparative Restriktion

Für eine anschließende *In vitro*-Transkription wurden die Volumina der Restriktionsansätze erhöht, um eine größere DNA-Ausbeute zu erzielen:

DNA-Lösung	max. 10 µg
10 x Restriktionspuffer	10 µl
Restriktionsenzym	10-25 U
DEPC-H ₂ O	ad 100 µl

Um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten, wurden nach 2 h Inkubation bei der für das Enzym optimalen Temperatur weitere 5 U des Enzyms zum Ansatz gegeben und die Inkubation für eine weitere Stunde fortgesetzt.

Bei einer Restriktion mit zwei Enzymen wurden Universalpuffer wie Tango^Y (Fermentas) eingesetzt. Konnte ein Doppelverdau aufgrund abweichender Temperatur- bzw. Pufferanforderungen der einzelnen Enzyme nicht durchgeführt werden, wurde die Restriktion in zwei separate Schritte unterteilt. Dazu musste der Ansatz nach dem ersten Verdau mit Hilfe des „NucleoSpin[®]“-Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt werden.

3.2.5. DNA-Quantifizierung

3.2.5.1. Spektrophotometrische Quantifizierung

DNA absorbiert UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei die Konzentration von doppelsträngiger DNA proportional zu der OD_{260} im Bereich von 0.1-0.8 ist (Cryer et al., 1975), eine OD_{260} von 1 entspricht demnach einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Eine zusätzliche Information über die Reinheit der DNA gibt zudem das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} . Die Werte unter 1.5 deuten auf eine hohe Reinheit der DNA hin, wohingegen Werte über 1.5 auf eine Proteinkontamination schließen lassen.

Um die DNA-Konzentration zu ermitteln, wurde die OD der bis zu 50-fach verdünnten DNA-Lösung in einer UV-Küvette im UV-Bereich von 260 nm gemessen (Eppendorf BioPhotometer).

3.2.5.2. Quantifizierung anhand Agarosegelelektrophorese

Als alternative Methode der DNA-Konzentrationsbestimmung diente der Vergleich der jeweiligen Bandenintensitäten mit denen der Markerbanden nach der erfolgten Agarosegelaufentrennung. Um eine Abschätzung zu ermöglichen, mussten die Volumina der aufgetragenen DNA-Proben im Verhältnis zum verwendeten Marker entsprechend ihrer Molekulargröße berücksichtigt werden. Anhand der bekannten Konzentration der Marker-DNA konnten die DNA-Konzentrationen der Proben grob ermittelt werden.

3.2.6. Plasmid-DNA-Übertragung in Bakterienzellen

Die Einführung von Plasmid-DNA in hochkompetente *E. coli*-Zellen wurde durch die Behandlung mit Mg^{2+} , Rb^+ und Ca^{2+} und einem anschließenden Hitzeschock ermöglicht (Hanahan, 1983). Um die Zellen auf die Transformation vorzubereiten, wurden sie in magnesiumhaltigen Medien angezogen, mit den oben genannten Salzen über kurze Zeit inkubiert, aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.6.1. Präparation der hochkompetenten *E. coli*-Zellen

10 ml LB-Medium wurden mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und üN bei 37 °C angezogen. Mit 0,6 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium, dem 0,25 ml 1 M MgSO₄ und 1 M MgCl₂ zugesetzt wurden, in einem 1000 ml-Erlenmeyerkolben inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die 20 min auf Eis abgekühlte Zellsuspension wurde in sterilen 50 ml Falconröhrchen zentrifugiert (2000 g, 15 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde in 10 ml Transformationspuffer I resuspendiert und 60-120 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Sediment in 10 ml Transformationspuffer II aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl-Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

Transformationspuffer I (sterilfiltriert)

Kaliumacetat, pH 5.8	30 mM
RbCl	50 mM
MnCl ₂	50 mM
CaCl ₂	10 mM

Transformationspuffer II (sterilfiltriert)

MOPS, pH 7.0	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 % (v/v)

3.2.6.2. Transformation

Um die Plasmide in die hochkompetenten *E. coli*-Zellen einzubringen, wurden 0,01-1 µg DNA zu den auf Eis aufgetauten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden nun 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend sofort 3 min auf Eis abgekühlt. Um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu ermöglichen, wurden 800 µl vorgewärmten LB-Mediums hinzugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die Ausplattierung auf selektiven LB-Platten.

3.2.7. Herstellung von Glycerin-Stocks

Für die Stammhaltung wurden 0,75 ml einer Zellsuspension mit 0,25 ml 87 %igem sterilen Glycerin gemischt und in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß bei -80 °C gelagert.

3.2.8. Whole mount-RNA-*in situ*-Hybridisierung (ISH)

Die Methode der RNA-*In situ*-Hybridisierung ermöglicht die hochsensitive Detektion von mRNA in Zellen, Geweben oder ganzen Embryonen (*Whole mount*-Präparate). Da in der Vorbereitung das Gewebe fixiert werden muss, erlaubt sie jedoch nur eine Momentaufnahme der Genaktivität zum Zeitpunkt der Fixierung.

Um die mRNA sichtbar zu machen, wird die Hybridisierung mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonde durchgeführt. Anschließend bindet daran ein anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, das sich durch eine Farbreaktion sichtbar machen lässt.

3.2.8.1. *In vitro*-Transkription

Die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden werden anhand einer DNA-Vorlage *In vitro* transkribiert. Neben der DNA-Vorlage, die sich auf einem bakteriellen Plasmid mit geeigneten RNA-Polymerasebindesequenzen befindet, werden Digoxigenin-markierte NTPs und die entsprechende RNA-Polymerase benötigt.

Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

Geschnittene Plasmid-DNA	1 µg (x µl)
DIG-NTPs	2 µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
RNase-Inhibitor (100 U/µl)	2 µl
DEPC-H ₂ O	(12 µl – x µl)
RNA-Polymerase	2 µl

Dieser Ansatz wurde vermischt, anzentrifugiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die RNA-Sonden-Ausbeute zu erhöhen, wurden anschließend folgende Komponenten hinzugefügt:

DEPC-H ₂ O	7 µl
DIG-NTPs	1 µl
10 x Transkriptionspuffer	1 µl
RNA-Polymerase	1 µl

Das so erhaltene Gesamtvolumen von 30 µl wurde erneut gemischt, anzentrifugiert und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss wurde das Transkriptionsprodukt auf Eis gefällt. Dazu wurde nach Zugabe von 1,5 µl 0,5 M EDTA und 3,75 µl 4 M LiCl und 100 µl 100 %igem EtOH die Probe gemischt und üN bei -20 °C gelagert. Der Ansatz wurde bei 13.000 Upm (4 °C) für 45 min zentrifugiert. Nach der Trocknung des RNA-Pellets in einem Eppendorf Concentrator 5301 wurden 50 µl DEPC-H₂O, 5 µl 4 M LiCl und 150 µl 100 % EtOH hinzugefügt und die RNA wiederum für 1 h bei -20 °C gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 13.000 Upm (4 °C) für 30 min und Trocknung des Pellets wurde die RNA in 25 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Zur Verifizierung und Quantifizierung des gereinigten Transkriptionsprodukts wurden jeweils 1 µl der RNA-Sonden unter denaturierenden Bedingungen (siehe 3.2.3) auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.8.2. Vorbehandlung

Die folgenden Schritte wurden – soweit nicht anders beschrieben – bei Raumtemperatur für 5 min durchgeführt.

Die Hühner- bzw. Mausembryonen wurden in Lockscher Lösung in kraniokaudaler Körperachse überstreckt präpariert und in 4 %igem PFA üN bei 4 °C fixiert. Im Anschluss wurden die Embryonen zweimal in PBT gewaschen. In einer MeOH/PBT-Reihe (25 %, 50 %, 75 %, 2 x 100 % MeOH) wurden die Präparate entwässert, eine

Lagerung über einige Tage war zu diesem Zeitpunkt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ möglich. Für die Hybridisierung wurden die Embryonen in umgekehrter MeOH/PBT-Reihe wieder rehydriert.

Locksche Lösung

10 x Lösung A

NaCl 0,16 M

Lösung B

KCl 0,16 M

Lösung C

CaCl₂ 0,1 M

Die Lösungen wurden im Verhältnis 1:0,037:0,021 gemischt. Auf 1000 ml Lockscher Lösung wurden noch 0,2 g NaHCO₃ zugefügt.

10 x PBS (Stammlösung)

KH₂PO₄ 0,01 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaCl 1,37 M

KCl 0,027 M

Die Chemikalien wurden in DEPC-H₂O (1000 ml H₂O_{bidest} und 1 ml DEPC) gelöst. Die benötigte Arbeitslösung wurde mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt, auf den pH 7.4 eingestellt und autoklaviert.

PBT

1 x PBS

Tween 20 0,1 % (v/v)

4 % PFA

PFA 8 g

H₂O_{bidest} ad 50 ml

1 x DEPC-PBS 150 ml

Das Gemisch wurde auf 65 °C erwärmt und mit 1 M NaOH aufgeklärt, dann wurde mit weiteren 50 ml PBS aufgefüllt und der pH 7.4 mit HCl eingestellt. Nach dem Aliquotieren wurde die Fixierungslösung bei -20 °C gelagert.

3.2.8.3. Hybridisierung

Nach zweimaligem Waschen in PBT wurden die Embryonen zur schonenderen Behandlung in Falcon-Zellsiebe umgesetzt, die folgenden Schritte wurden in 6-well-Platten durchgeführt. Die Präparate wurden 1 h in 6 % H₂O₂ in PBT gebleicht, danach wurde dreimal in PBT gewaschen. Um die mRNA besser für die RNA-Sonden zugänglich zu machen, wurden die Embryonen mit 10 µg/ml Proteinase K in PBT behandelt:

- Hühnerembryonen bis HH-Stadium 22 Inkubation für 1min, bei älteren Embryonen etwas länger (bis max. 2 min).
- Mausembryonen bis ED 10.5 Inkubation für 1 min.

Die Embryonen wurden unmittelbar danach vorsichtig in 2 mg/ml Glycin in PBT umgesetzt und dort für 20 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBT wurden die Präparate 20 min in 0,2 % Glutaraldehyd/4 % PFA in PBT refixiert.

Nach zweimaligem Waschen wurden die Embryonen in den Prähybridierungsmix überführt und dort 2-3 h bei 68 °C inkubiert.

Prähybridierungsmix

Formamid	50 % (v/v)
5 x SSC, pH 4.5	
Hefe-tRNA	50 µg/ml
SDS	1 % (v/v)
Heparin	50 µg/ml

Nach der Prähybridisierung wurde die zuvor für 2 min bei 95 °C denaturierte RNA-Sonde in einer Konzentration von 1 µg/ml dem Prähybridierungsmix hinzugefügt. Alternativ konnte ein bereits benutzter, sterilfiltrierter Hybridisierungsmix verwendet

werden, der vorher für 2 min auf eine Temperatur von 70 °C erhitzt wurde. Ein bereits verwendeter Hybridisierungsmix konnte noch für weitere 2-3 Hybridisierungen eingesetzt werden. Die Hybridisierung wurde in N bei 68 °C durchgeführt.

3.2.8.4. Post-Hybridisierung

Der verwendete Hybridisierungsmix wurde sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Embryonen wurden 2 x 30 min mit der Lösung 1 bei Hybridisierungstemperatur gespült. Danach wurde für 10 min mit einem Gemisch aus Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Präparate 3 x mit Lösung 2 und 1 x mit Lösung 3 gewaschen. Dann wurden sie 2 x 30 min in Lösung 3 bei 60 °C inkubiert.

Lösung 1

Formamid	50 % (v/v)
5 x SSC, pH 4.5	
SDS	1 % (v/v)

Lösung 2

NaCl	0,5 M
Tris-HCl, pH 7.5	10 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

Lösung 3

Formamid	50 % (v/v)
2 x SSC, pH 4.5	

3.2.8.5. Antikörperadsorption und anschließende Waschschrte für Hühnerembryonen

Die Embryonen wurden 3 x in TBST gewaschen. Anschließend wurden sie in TBST mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Schafserum für 60-90 min bei Raumtemperatur geblockt. Währenddessen wurden für ein Endvolumen von 15 ml 22,5 mg Embryopulver ausgewogen, mit 3,5 ml TBST vermischt und bei 70 °C für 30 min erhitzt. Nach dem

Abkühlen auf Eis wurden 37,5 µl Schafserum und 7,4 µl anti-Digoxigenin-Antikörper hinzugefügt und dieses Gemisch für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde es 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Volumen von 15 ml mit TBST/10 % Schafserum aufgefüllt.

Die so vorbereitete Antikörperlösung wurde nun für die Antikörperadsorption auf die Embryonen gegeben und üN bei 4 °C bewegt inkubiert. Die Antikörperlösung konnte nach Verwendung bei 4 °C aufbewahrt und nochmals benutzt werden. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Präparate 4 x 1 h in TBST inkubiert. Anschließend wurden sie in NTMT überführt und üN bei 4 °C inkubiert.

10 x TBST (Stammlösung)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Tris-HCl, pH 7.5	25 ml
Tween 20	10 ml
H ₂ O bidest	ad 100 ml

Die Stammlösung wurde 10-fach verdünnt.

Embryopulver

Für die Gewinnung von Embryopulver wurden Hühnerembryonen bis zum Inkubationstag 6 bebrütet, explantiert und in 100 % EtOH fixiert. Anschließend wurden die Embryonen mit Hilfe der „Kritischen Punkt-Trocknung“ (CPD) dehydriert. Die Embryonen wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen aliquotiert und darin möglichst fein zermahlen. Sie wurden bei 4 °C aufbewahrt.

NTMT

NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 9.5	100 mM
MgCl ₂	50 mM
Tween 20	1 % (v/v)

3.2.8.6. Antikörperadsorption und anschließende Waschschr **Mausembryonen**

Die Mausembryonen wurden 3 x in MABT gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation für 60 min in MABT/2 % (w/v) BBR (Boehringer Blocking Reagenz). Danach wurden die Präparate 60 min in MABT/2 % (w/v) BBR/10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Schafserum geblockt. Diese Lösung wurde dann durch MABT/2 % (w/v) BBR/10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Schafserum mit anti-Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 ersetzt und üN bei 4 °C langsam bewegt inkubiert.

MAB (Stammlösung)

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

mit 10 N NaOH auf pH 7.5 eingestellt

Boehringer Blocking Reagenz (BBR; Stammlösung)

Das Blockierungsreagenz wurde in Maleinsäurepuffer (MAB) zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) unter Rühren und Erhitzen auf einem Heizblock oder in der Mikrowelle gelöst. Die Stammlösung wurde dann autoklaviert und bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Die 10 x Blockierungslösung wurde mit 1 x Maleinsäurepuffer zu einer 1 x konzentrierten Lösung verdünnt.

MABT

Maleinsäurepuffer (MAB)

Tween 20	0,1 % (v/v)
----------	-------------

Die Mausembryonen wurden dann 3 x mit MABT und anschließend 4 x 1 h mit MABT gewaschen. Es folgte eine Inkubation in NTMT üN bei 4 °C.

3.2.8.7. Färbung

Die Embryonen wurden 3 x 10 min in NTMT gewaschen. Die Färbung wurde in 5 ml NTMT mit 22,5 µl NBT und 17,5 µl BCIP unter konstanter Bewegung durchgeführt.

Nach dem Färbevorgang, der 15 min bis zu 24 h dauerte, wurden die Embryonen 2 x in PBT gewaschen und anschließend in 4 % PFA aufbewahrt.

3.2.8.8. Photographische Dokumentation

Die Dokumentation der gefärbten Präparate wurde mit einer Stereolupe der Fa. Olympus analog durchgeführt. Die entwickelten Dias wurden mit Hilfe eines Epson Perfection 4990 Photo-Scanners digitalisiert und mit Adobe® Photoshop® CS 2 geringfügig nachbearbeitet.

3.2.9. Immunhistochemische Verfahren

3.2.9.1. Indirekte Immunhistochemie

In diesem Verfahren wird ein unkonjugierter Primärantikörper eingesetzt, an den in einer zweiten Reaktion spezifisch ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet. Der Primärantikörper stellt somit ein Antigen für den Sekundärantikörper dar. Im Anschluss findet die Substrat-Chromogenreaktion statt. Die indirekte Methode ist somit empfindlicher als die früher häufig angewandte direkte Technik, bei der der Primärantikörper mit einem Enzym gekoppelt ist, da mehrere Sekundärantikörper an einem Primärantikörper binden können.

Eine weitere - noch sehr viel sensitivere - Variante stellt das Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Verfahren dar. Hierbei werden ein unkonjugierter Primär- und ein unkonjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. Die dritte Komponente besteht aus dem so genannten löslichen PAP-Komplex. Er ist aus drei Peroxidasemolekülen und zwei Antikörpern gegen Peroxidase zusammengesetzt. Aus der großen Anzahl an Enzymmolekülen pro Antigen erklärt sich die hohe Empfindlichkeit der Reaktion.

3.2.9.1.1. Vorbehandlung der Embryonen

Die Embryonen wurden in Lockscher Lösung präpariert und in 4 % PFA bei 4 °C üN fixiert. Anschließend wurden sie in einer MeOH/PBT-Reihe entwässert und bei -20 °C üN oder über einen Zeitraum von einigen Tagen aufbewahrt.

Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Embryonen 3 h in einem Gemisch aus MeOH und H₂O₂ (0,75 % (v/v)) inkubiert. Nach der Rehydrierung und alternierendem Waschen in PBS und PBT über ca. 2 h fand eine Antigendemaskierung in 0,01 M Zitratpuffer, pH 6,0, bei 96 °C für 10 min im Wasserbad statt.

3.2.9.1.2. Antikörperadsorption und Färbung

Die Embryonen wurden dreimal in PBT für je 5 min gewaschen. Der Primärantikörper wurde in der empfohlenen Verdünnung in Antikörper-Diluent (DAKO) angesetzt und die Präparate üN bei 4 °C leicht bewegt darin inkubiert.

Daraufhin wurden sie insgesamt 3 h alternierend in PBS und PBT gespült. Je nach Verfahren wurden die Präparate dann üN bei 4 °C mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem (indirektes Verfahren) bzw. unkonjugiertem Sekundärantikörper (PAP-Verfahren) in Antikörper-Diluent (DAKO) inkubiert.

Es folgte wieder dreistündiges Waschen in PBS und PBT. Für die Durchführung des PAP-Verfahrens erfolgte eine dritte Inkubation üN bei 4 °C mit dem PAP-Komplex in empfohlener Konzentration in Antikörper-Diluent (DAKO). In diesem Fall wurden die Embryonen anschließend wieder 2 h in PBS und PBT gewaschen.

Nach einer einstündigen Inkubation in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6, erfolgte die Entwicklung der Färbung in DAB-Substratlösung:

0,05 M Tris-HCl, pH 7.6	22 ml
DAB	10 mg

Die Lösung wurde filtriert, um unlösliche Anteile des DAB zu entfernen. Zur Verstärkung der Färbereaktion wurden Imidazol und Ammoniumnickelsulfat hinzugefügt:

Imidazol	16,88 mg
1 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	
in 0,05 M Tris-HCl, pH 7.6	3 ml

Um die Reaktion zu starten, wurden 0,3 μl H_2O_2 hinzugegeben. Die Embryonen wurden unter Lichtausschluss leicht bewegt inkubiert. Nach Beendigung der Färbereaktion wurden die Präparate 2 x 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und anschließend in 4 % PFA bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.9.1.3. Photographische Dokumentation

Die Dokumentation der gefärbten Präparate wurde mit einer Stereolupe der Fa. Olympus analog durchgeführt. Die entwickelten Dias wurden mit Hilfe eines Epson Perfection 4990 Photo-Scanners digitalisiert und mit Adobe® Photoshop® CS 2 geringfügig nachbearbeitet.

3.2.10. Kultivierung von überexprimierenden Zelllinien und Kontrollzelllinien

Für die Kultivierung proteinbildender Zellen und der Kontrollzelllinie 10T1/2 wurden folgende Medien verwendet:

Q2bn (<i>hBmp2</i> /AS- <i>Bmp2</i>)	45 % (v/v) DMEM, 45 % (v/v) Ham's F-12, 2 % (v/v) Hühnerserum, 8 % (v/v) fötales Kälberserum, 800 $\mu\text{g/ml}$ G418, 100 U/ml Penicillin-100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin-Lösung (1 x Pen/Strep), 20 mM Glutamin
10T1/2	90 % (v/v) DMEM (+ Pyr, + 20 mM Gln), 10 % (v/v) fötales Kälberserum, 1 x Pen/Strep

3.2.10.1. Aggregation tierischer Zellen für die Implantation

Um die Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo zu beeinflussen, wurden u. a. Aggregate proteinbildender Zellen benötigt, die dann in den linken oder rechten Sinusbereich lebender Embryonen eingesetzt werden konnten.

Diese Zellaggregate erhielt man, indem man die adhären Zellen einer konfluent gewachsenen Kulturflasche mit der „*Cell Dissociation Solution*“ (Fa. Sigma) ablöste und einen Teil der Zellsuspension auf eine mit 1 % (w/v) Agar beschichteten bakteriellen Petrischale in Medium ohne Selektionsdruck ausbrachte. Nach ein bis zwei Tagen hatten die Zellen ausreichend große Zellaggregate gebildet, die dann für die Implantation verwendet werden konnten.

3.2.11. Manipulation von Hühnerembryonen *in vitro* und *in vivo*

3.2.11.1. *Whole embryo*-Kultur

Die *Whole embryo*-Kultur ermöglicht die Kultivierung jüngerer Hühnerembryonen außerhalb des Eies. Für diese Methode eignen sich Embryonen ab HH 12, die unter optimalen Kulturbedingungen für etwa einen Tag inkubiert werden können, bis sie ungefähr HH-Stadium 16/17 erreicht haben. Diese Methode ist notwendig, um die Entwicklung des Proepikards mit Hilfe von implantierten *Beads* (Trägerperlen) oder Zellaggregaten (siehe 3.2.10.1) zu beeinflussen, da der Zugang zum Proepikard und zum Herzen *in ovo* aufgrund der nach ventral nach unten gerichteten Lage des Embryos in den früheren Stadien nicht möglich ist.

Die Methode wurde leicht variiert nach dem Verfahren von Chapman et. al (2001) durchgeführt. In der Vorbereitung wurden 0,72 g Bacto-Agar in 120 ml Lockscher Lösung in der Mikrowelle oder im Autoklaven gelöst. In der Zwischenzeit wurde aus ca. 15 Eiern das dünnflüssige Albumin abgezogen und mit 120 µl Penicillin/Streptomycin-Lösung (Fa. Biochrom) versetzt. Der Agar und das Albumin wurden dann im Wasserbad auf eine Temperatur von 49 °C äquilibriert und anschließend gut vermischt. Jeweils 3 ml der Agarlösung wurden dann zügig und ohne Luftblasen mit einer Transferpipette auf Schälchen mit einem Durchmesser von 3,5 cm verteilt.

Die Bruteier wurden über einer Glaspetrischale aufgeschlagen und das auf dem Dotter befindliche Eiweiß vorsichtig mit sterilem Krepppapier entfernt. Ein vorbereiteter Filterpapierring (Innen-/Außendurchmesser 22/26 mm) wurde auf die Vitellinmembran gelegt, so dass sich der Embryo zentral in dessen Öffnung befand. Nun wurde der Filterpapierring mit dem Embryo herausgeschnitten und mit der dorsalen Seite nach oben auf die Agarschale gelegt, in dessen Mitte zuvor eine kleine Mulde geformt wurde, die mit Ham's F-10 wieder aufgefüllt worden war. Auf den Filterpapierring wurde nun von oben ein zweiter Ring gelegt und leicht festgedrückt. Um einer Austrocknung entgegenzuwirken, wurden mehrere Tropfen Ham's F-10 auf den Embryo gegeben. Die Inkubation erfolgte im Brüter bei 38 °C in einer großen Glaspetrischale.

3.2.11.2. 1. Experiment (in der *Whole embryo*-Kultur): Mechanisch induzierte Inversion der Körperrotation

Für die Beurteilung der topographischen Einflüsse des myokardialen Gewebes auf die Induktion des Proepikards wurden *in vitro* mechanisch induzierte Inversionen der Körperrotation erzeugt. Dazu wurden *Whole embryo*-Kulturen von Embryonen im HH-Stadium 12 angelegt. Mit einer Pinzette wurde die nach rechts liegende C-förmige Herzscheife vorsichtig auf die linke Seite des Embryos verlagert. Das führte während der folgenden Inkubation zu einer invertierten Körperrotation des Embryos. Die Embryonen wurden nach einer 24-stündigen Inkubationsphase in einem überstreckten Zustand präpariert, mit Lockscher Lösung und Asami-Lösung gespült und je nach Verwendungszweck fixiert (REM, ISH).

3.2.11.3. 2. Experiment: Organkulturen

Für die Beurteilung der Induktion des Proepikards wurde eine Methode der Kultivierung etabliert, bei der das embryonale Herz als Organ mit dem ihm umgebenen Gewebe und der Proepikardregion verwendet wurde. Dazu wurden Hühnerembryonen im HH-Stadium 12 explantiert und in Lockscher Lösung in einer Wachsschale festgesteckt. Kranial der Ausflussbahn des Herzens wurde das Entoderm mit einer Federschere über die Breite des Embryos aufgeschnitten. Ausgehend vom Kopf wurden die Körperwände lateral des Embryos bis zur anterioren Darmpforte aufgetrennt. Dabei wurden zu beiden Seiten der Darmpforte längere Gewebsschenkel

belassen. Um den Gewebekblock später in Kultur unter weitestgehend normalen Spannungsverhältnissen zu halten, wurden seitlich der Körperwand großflächige rechteckige Bereiche der Somatopleura belassen. Der Organblock wurde gerade auf einem rechteckigen Stück Schalenmembran ausgerichtet und mit Hilfe von Pinzetten vorsichtig daran festgeheftet. Das Präparat wurde in einer Schale einer 4 *well*-Platte in 200 µl Ham's F-10 bei 38 °C für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Gewebeoberfläche mit Lockscher Lösung gespült, das Herz mit Asami-Lösung dilatiert und der Organblock für eine nachfolgende *In situ*-Hybridisierung in 4 % PFA bzw. für die rasterelektronische Untersuchung in 1,5 % Glutaraldehyd-Lösung und Bouin fixiert.

3.2.11.4. Entwicklung experimenteller Verfahren zur Testung möglicher Proepikard induzierender und hemmender Faktoren

3.2.11.4.1. 1. Experiment: Implantation von *Beads* und Zellaggregaten in *Whole embryo*-Kulturen

Die Implantation tierischer proteinbildender Zellaggregate erfolgte *in vitro* in *Whole embryo*-Kulturen im HH-Stadium 12. Dazu wurde das Endoderm des Hühnerembryos auf Höhe des rechten oder linken Sinusschenkels mit einer Wolframnadel eingeritzt und in das darunter liegende Sinusgewebe eine kleine Öffnung geschnitten. Durch diesen Spalt wurde mit Hilfe einer Glaskapillare und einer Wolframnadel ein Zellaggregat bzw. Faktoren beladener *Bead* geschoben und möglichst im Sinus venosus fixiert. Der Embryo wurde dann bis zum HH-Stadium 17/18 bei 38 °C kultiviert.

Der Abbruch der Kulturen erfolgte durch Ausschneiden des Embryos aus dem extraembryonalen Gewebe und der Fixierung in 4 % PFA in überstrecktem Zustand. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden MeOH/PBT-Reihe dehydriert und bei -20 °C in MeOH gelagert. Die Untersuchung der Embryonen erfolgte mikroskopisch und ggf. mittels *In situ*-Hybridisierung (siehe 3.2.8).

3.2.11.4.2. 2. Experiment: Implantation von *Beads* und Zellaggregaten in Organkulturen

Die Implantation von *Beads* bzw. Zellaggregaten erfolgte analog zu der in Abschnitt 3.2.11.4.1 beschriebenen Vorgehensweise in Organkulturen im HH-Stadium 12, bevor

der Gewebekblock entnommen wurde (siehe 3.2.11.3). Es wurden Heparin beladene Acrylperlen (Fa. Sigma) verwendet, die je nach Größe mit einer feinen Präparierschere zerschnitten und einzeln im Sinus venosus platziert wurden.

Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Embryonen wie in 3.2.11.4 beschrieben präpariert und fixiert. Die Analyse erfolgte ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch oder durch *In situ*-Hybridisierung.

3.2.11.4.3. 3. Experiment: Proepikardiale Gewebekulturen

In einer weiteren experimentellen Methode zur Testung Proepikard induzierender bzw. hemmender Faktoren wurden proepikardiale Gewebekulturen angelegt. Dazu wurde in Embryonen im HH-Stadium 12 das Gewebe im Bereich des Sinus venosus, in dem sich später die proepikardialen Anlagen entwickeln, explantiert und in 200 µl Ham's F-10 ohne Zusatz von Seren in einer Schale einer 4-well-Platte auf einen kleinen Agarhügel bzw. auf ein kleines Stück Schalenmembran aufgesetzt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 38 °C. Anschließend wurde das Präparat hinsichtlich der Bildung der proepikardialen Anlagen mikroskopisch überprüft.

3.2.11.5. Herstellung von Wachtel/Huhn-Chimären

Männer etablierte 1999 eine Methode zum Nachweis des Zellschicksals der proepikardialen Vorläuferzellen. Dazu wurden Transplantationsexperimente durchgeführt, bei denen ein Hühnerembryo im HH-Stadium 16/17 (3. Bebrütungstag) als Wirt und ein Wachtelembrion desselben Stadiums als Spender verwendet wurden.

Die Hühnereier wurden unter einem Stereomikroskop gefenstert und der Embryo in einem Flüssigkeitskissen mit Lockscher Lösung angehoben. Die Perikardhöhle wurde geöffnet (Männer, 1993). Ein kleines rechteckiges Stück Schalenmembran wurde so vorbereitet, dass es zwischen die dorsale Wand des Herzens und den noch nicht adhärenen Zotten des Proepikards passte. Dieses Stück Schalenmembran wurde dann als Trägermaterial für die proepikardialen Zotten des Donors eingesetzt. Dazu wurden die Wachtelembrionen explantiert, in einer Wachsschale gespült und mit Insektennadeln mit der ventralen Seite nach oben festgesteckt. Die Perikardhöhle wurde geöffnet

und der Herzschlauch vorsichtig durch Schnitte mit einer feinen Schere an der sinuatrialen Grenze und der Ausflussbahn entfernt. In das venöse rechte Gefäß wurde nun die vorbereitete Schalenmembran geschoben. Um den Sinus venosus von den Körpervenen zu trennen, wurde zusätzlich an den lateralen Mesokardien geschnitten. Das Transplantat wurde dann in die Perikardhöhle des Hühnerembryos transferiert und zwischen dem Proepikard und dem Herzen platziert. Die Schalenmembran fungierte so nicht nur als Trägermaterial für das Spenderproepikard, sondern verhinderte oder verzögerte zusätzlich die Ausbildung der sekundären Gewebebrücke des Hühnerproepikards an das ventrale Myokard des Herzens (Männer, 1993). Nach der Transplantation wurde der Hühnerembryo durch Abziehen von Eiweiß wieder abgesenkt, das Ei mit Gewebeklebeband verschlossen und im Flachbrüter unter normalen Bedingungen (siehe 3.1.7) reinkubiert.

3.2.12. Herstellung der histologischen Präparate

Um histologische Präparate zu erhalten, wurden die Embryonen üN bei 50 °C in einer 7,5 % Gelatine/15 % Saccharoselösung inkubiert und in Trockeneis gekühltem Isopentan schockgefroren. Die Schnitte (20 µm) wurden in einem Kryostaten hergestellt.

Die Herstellung der Kryoschnitte für die Fluoreszenzdoppelfärbungen der Wachtel/Huhn-Chimären mit dem Wachtelendothel spezifischen Antikörper QH1 und dem Lymphendothel spezifischen polyklonalen Antikörper Prox1 erfolgte in Kooperation mit Prof. J. Wilting und Frau K. Buttler, Göttingen.

3.2.13. Rasterelektronenmikroskopie

Nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Präparate nach der „Kritischen Punkt-Trocknung“ (CPD) über CO₂ getrocknet. Die Präparate wurden mit Leitsilber auf Aluminiumträger aufgeklebt und mit Gold-Palladium (Schichtdicke 40-50 nm) beschichtet. Dann erfolgten die rasterelektronische Untersuchung („DSM 960“, Fa. Zeiss) und die fotografische Dokumentation exemplarischer Präparate.

4. ERGEBNISSE

4.1. Teil 1: Topogenese des Proepikards im Hühner- und Mausembryo

Im Hühnerembryo beginnt sich im HH-Stadium 14 (Anfang des 3. Bebrütungstag) das Zölommesothel, das die ventrale Wand der rechten Hälfte des Sinus venosus bedeckt, zu verdicken und kurze villöse Ausstülpungen zu bilden (Abb. 9A, F). Im HH-Stadium 15 setzt sich dieser räumlich begrenzte Prozess fort, bis im HH-Stadium 15/16 auch auf der linken Seite des Sinus venosus erste mesotheliale Ausstülpungen sichtbar werden (Abb. 9C, H). Im HH-Stadium 16 ist der Phänotyp der rechten Proepikardanlage voll entwickelt, die Ausstülpungen bilden eine blumenkohlartige Ansammlung mesothelialer Zotten (Abb. 9C, H). Im HH-Stadium 17 nehmen die Zotten des rechten Proepikards Kontakt zum dorsalen Teil des Kammermyokards auf, wodurch eine sekundäre Gewebebrücke entsteht. Die später erschienene linke Anlage bleibt hingegen in einem rudimentären Zustand und entwickelt sich nicht in dem Maße wie das rechte Proepikard, sondern bildet sich in den HH-Stadien 18/19 zurück (Abb. 9D, E, I, J).

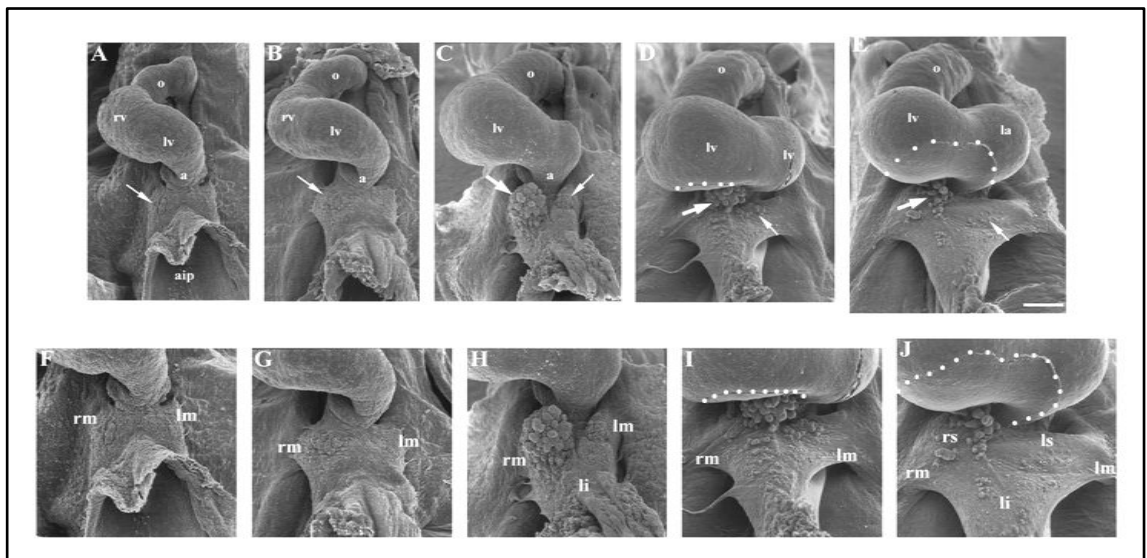


Abb. 9. Rasterelektronische Darstellung der Bildung des Proepikards im Hühnerembryo. Ventrale Sicht auf den venösen Pol der Herzschleife und das sich entwickelnde Proepikard im HH-Stadium 14 (A, F), HH-Stadium 15 (B, G), HH-Stadium 16 (C, H), HH-Stadium 17/18 (D, I) und HH-Stadium 18/19 (E, J). Die rechte Proepikardanlage (rechter Pfeil) bildet sich im HH-Stadium 14, während die linke Proepikardanlage (linker Pfeil) im HH-Stadium 15/16 erscheint. Von den beiden proepikardialen Anlagen entwickelt lediglich die rechte Anlage das reife Proepikard. Die linke Anlage bleibt in einem rudimentären Zustand und verschwindet im HH-Stadium 18/19. Das rechte Proepikard bildet im HH-Stadium 17 einen festen Kontakt mit der Herzoberfläche. Das vom Proepikard stammende primitive Epikard breitet sich als epitheliale Schicht über der kardialen Oberfläche aus (Grenze mit Punkten

markiert). Der Hühnerembryo besitzt kein Septum transversum, stattdessen befindet sich zwischen dem Sinus venosus und den lateralen Körperwänden das rechte und linke Mesocardium laterale. a, gemeinsamer Vorhof; aip, vordere Darmforte; la, entwickelnder linker Vorhof; li, Leber; lm, linkes Mesocardium laterale; ls, linkes Sinushorn; lv, embryonaler linker Ventrikel; o, Ausflussbahn; ra, entwickelnder rechter Vorhof; rm, rechtes Mesocardium laterale; rs, rechtes Sinushorn; rv, embryonaler rechter Ventrikel. Maßstabsbalken = 200 µm.

Ausgehend von der sekundären Gewebebrücke beginnt in den HH-Stadien 17/18 der Transfer proepikardialer Zellen auf das Myokard im Bereich der dorsalen Wand des Kammeranteils des Herzschlauchs. Die proepikardialen Zellen breiteten sich vom Kontaktpunkt der Gewebebrücke, die auch als sekundäres dorsales Mesokard bezeichnet werden kann (Männer, 1992), auf dem Myokardepithel aus (Abb. 9D, E, I, J).

Durch *In situ*-Hybridisierungen mit den proepikardialen Marker-Sonden für Tbx18 und Wt1 bestätigten sich die morphologisch ermittelten Befunde der bilateral asymmetrischen Entwicklung der Proepikardanlagen im Hühnerembryo. Beide proepikardialen Marker zeigten eine deutliche Expression in der rechten Proepikardanlage (Tbx18: Abb. 10B; Wt1: Daten nicht gezeigt), jedoch nur eine schwache Expression in der linken Proepikardanlage (Abb. 10B).

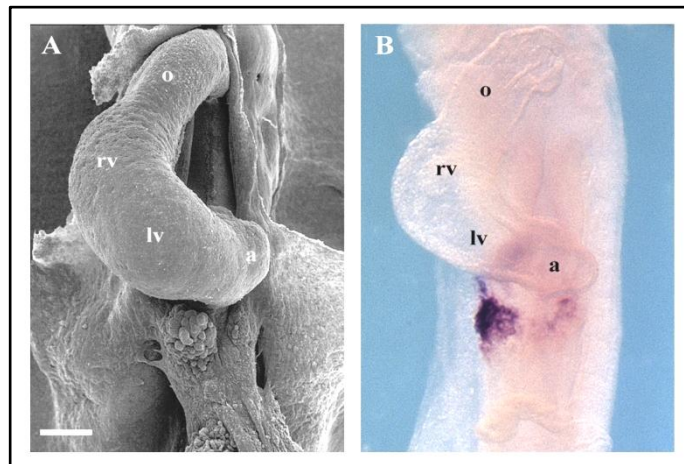


Abb. 10. Korrelation zwischen den morphologischen Befunden (A) und dem Expressionsmuster des proepikardialen Markergens Tbx18 (B). Ventrale Ansichten von embryonalen Hühnerherzen im HH-Stadium 16. Abkürzungen gemäß Abb. 9. Maßstabsbalken = 200 µm.

Im Mausembryo tauchen an ED 8.5 im Bereich der ventrokaudalen Wand der rechten und linken Hälfte des Sinus venosus die rechte und linke proepikardiale Anlage in Form

von ovalen Arealen auf (Abb. 11A, F). Die mesotheliale Zellen, die diese Bereiche bedecken, weisen zahlreiche blasenartige Ausstülpungen an den apikalen Zellmembranen auf, während die umgebenden Zellen eine glatte Zelloberfläche besitzen (Abb. 13A). Mittels *In situ*-Hybridisierung wurde mit dem proepikardialen Marker Tbx18 an ED 8.5 eine entsprechende bilateral symmetrische Expression in der ventrokaudalen Wand der rechten und linken Hälfte des Sinus venosus nachgewiesen (Abb. 12A.). An ED 9.0 rücken die beiden deutlich vergrößerten Proepikardanlagen auf die Mittellinie des Embryos zu (Abb. 11B, G). Diese Beobachtung wurde durch die Befunde der *In situ*-Hybridisierung mit Tbx18 gestützt (Abb. 12B). An ED 9.5 verschmelzen die symmetrischen Anlagen medial im Bereich der perikardialen Oberfläche des Septum transversum miteinander (Abb. 11C, H; Abb. 12C). Das vom voll entwickelten Proepikard eingenommene Areal hat die Form eines Dreiecks, dessen Basis die kaudale Grenze der ventralen Wand des Sinus venosus und des rechten und linken Sinushorns bedeckt. Die Spitze des Dreiecks weist auf die Mitte der ventralen Wand der primitiven Perikardhöhle (Abb. 13C).

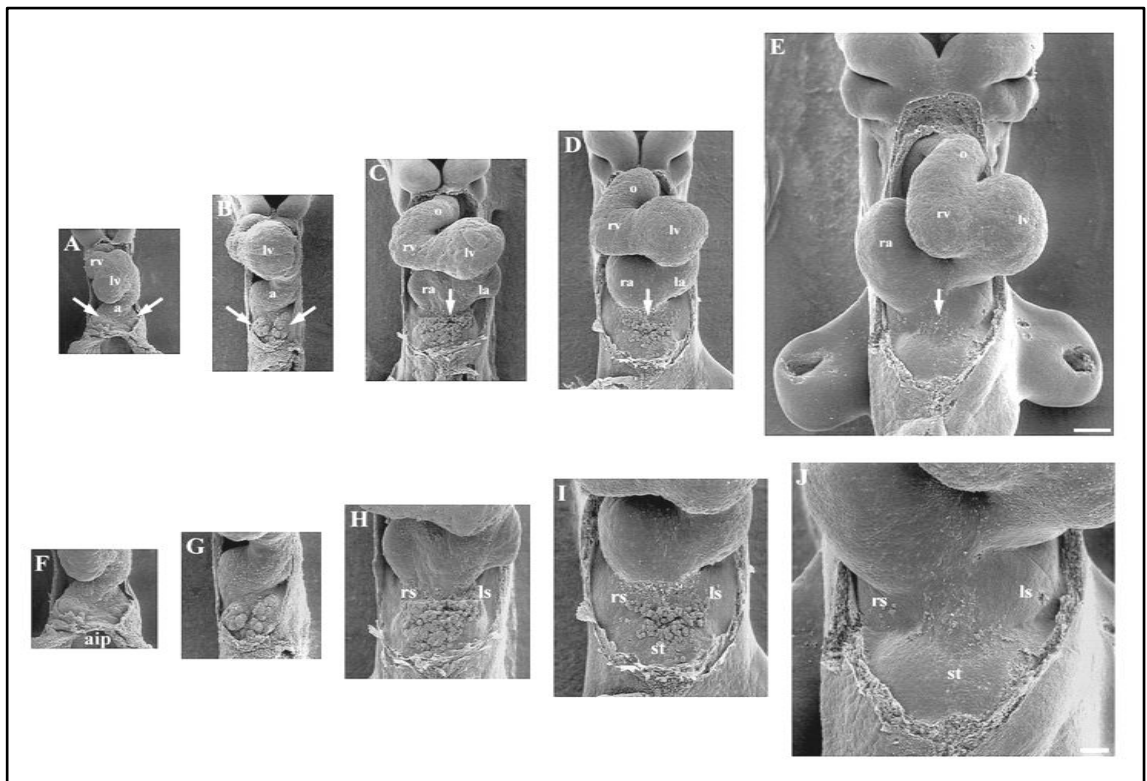


Abb. 11. Rasterelektronische Darstellung der Bildung des Proepikards im Mausembryo. Ventrale Sicht auf den venösen Pol der Herzschleife und das Proepikard an ED 8.5 (A, F), ED 9.0 (B, G), ED 9.5 (D, I) und ED 10.5 (E, J). Die beiden proepikardialen Anlagen (Pfeile) erscheinen gleichzeitig an ED 8.5. Sie rücken auf die embryonale Mittellinie zu, wo sie zu verschmelzen beginnen, bis sie an ED 9.0 ein

einzelnes zusammenhängendes Proepikard bilden. Der reife proepikardiale Phänotyp ist an ED 9.5 erreicht. Er erscheint als dreieckige Ansammlung von vesikulären Zellaggregaten. An ED 10.5 befinden sich nur noch wenige proepikardiale Vesikel an der ventrokaudalen Wand des Sinus venosus. Das frühere Areal des Proepikards erscheint als rautenförmige Struktur. a, gemeinsamer Vorhof; aip, vordere Darmpforte; la, entwickelnder linker Vorhof; ls, linkes Sinushorn; lv, embryonaler linker Ventrikel; o, Ausflussbahn; ra, entwickelnder rechter Vorhof; rs, rechtes Sinushorn; rv, embryonaler rechter Ventrikel; st, Septum transversum. Maßstabsbalken = 200 µm.

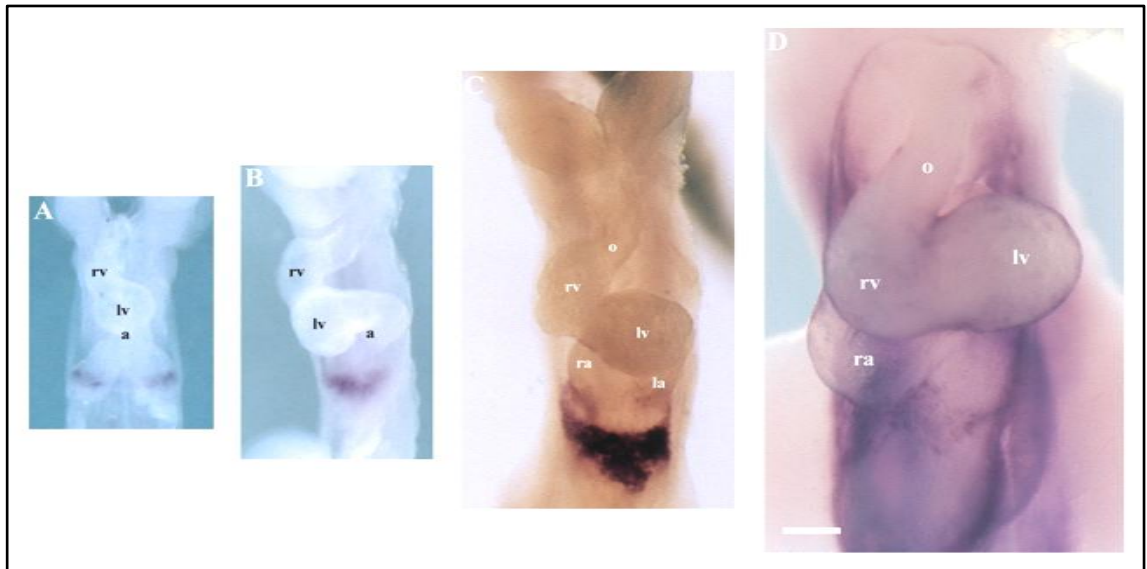


Abb. 12. Darstellung der Bildung des Proepikards im Mausembryo anhand von *Whole mount-ISH* mit RNA-Sonden für proepikardiale Markergene (Tbx18, A-C; Wt1, D). Ventrale Ansichten von embryonalen Mäuseherzen an ED 8.5 (A), ED 9.0 (B), ED 9.5 (C) und ED 10.5 (D). Abkürzungen gemäß Abb. 10. Maßstabsbalken = 200 µm.

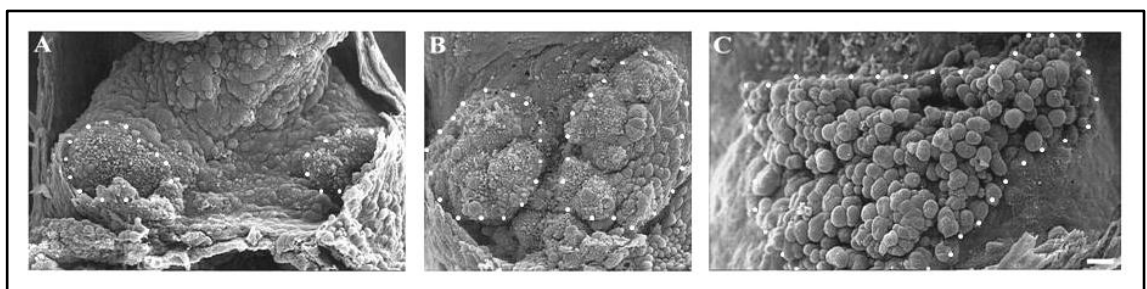


Abb. 13. Vergrößerte Ansichten des venösen Pols im Mausembryo an ED 8.5 (A), ED 9.0 (B) und ED 9.5 (C). Die zunächst voneinander getrennten Proepikardanlagen (markiert mit gepunkteten Linien; A) bewegen sich auf die embryonale Mittellinie zu (B) und verschmelzen dort miteinander, um ein einzelnes reifes Proepikard zu bilden (C). Maßstabsbalken = 20 µm.

Zwischen ED 9.5 und ED 10.5 werden die meisten dieser Zellaggregate als Vesikel abgeschnürt und frei schwebend in die Perikardhöhle entlassen. Die Zellaggregate

setzen sich am nackten Kammermyokard des Herzschlauchs fest, wo sie durch Verschmelzen der sich ausbreitenden Zellhaufen das primitive Epikard bilden (Abb. 14).

An ED 10.5 sind nur noch vereinzelt kleine proepikardiale Vesikel an der ventrokaudalen Wand des Sinus venosus vorhanden (Abb. 11E, J). Das Areal, in dem sich das Proepikard gebildet hat, hat nun einen rautenförmigen Umriss. In der *In situ*-Hybridisierung zeigt sich hier nur noch eine schwache Expression des proepikardialen Markers Wt1 (Abb. 12D).

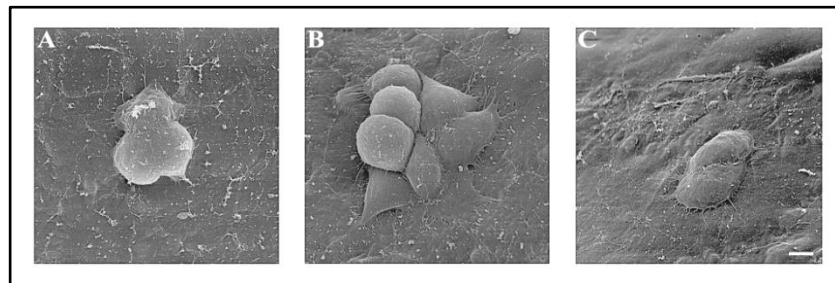


Abb. 14. Vergrößerte Ansichten von adhärennten Zellaggregaten an der myokardialen Oberfläche im Mausembryo an ED 10.5 (A-C). Die vesikulären Zellaggregate, die sich vom Proepikard abschnüren, schweben frei durch die geschlossene Perikardhöhle und heften sich an der Oberfläche des embryonalen Herzens an. Dort flachen sich die Zellen ab, breiten sich als zunächst isolierte „Flecken“ von epikardialen Mesothelzellen aus, verschmelzen miteinander und bilden so das primitive Epikard. Maßstabsbalken = 5 μ m.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Bmp-Signalfaktoren eine wichtige Rolle in der Regulation der Proepikardidentität im Hühnerembryo spielen (Schlueter et al., 2006; Kruithof et al., 2006). Im Hühnerembryo wird Bmp2 während der Proepikardentwicklung in einem bilateral symmetrischen Muster im Myokard des Sinus venosus kranial des Proepikards exprimiert, wohingegen Bmp4 asymmetrisch in der rechten Proepikardanlage nachgewiesen werden konnte (Schlueter et al., 2006; Kruithof et al., 2006). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsmuster von Bmp2 und Bmp4 während der Proepikardentwicklung im Mausembryo untersucht.

Während der beginnenden Entwicklung der bilateral symmetrischen Proepikardanlagen an ED 8.5 konnte nur eine schwache Expression von Bmp2 in der Wand des Sinus

venosus nachgewiesen werden (Abb. 15A). Bmp4 wurde schwach in einem bilateral symmetrischen Muster jeweils medial der beiden Proepikardanlagen angefärbt (Abb. 16A). Während der darauf folgenden Reifungsphase des Proepikards an ED 9.0 bis ED 9.5 wurden sowohl Bmp2 als auch Bmp4 in der ventralen Wand des Sinus venosus kranial der fusionierenden proepikardialen Anlagen exprimiert (Abb. 15B, E; Abb. 16B, E). Dabei wurde Bmp2 entlang der Wand der beiden Sinushörner und Bmp4 in einem deutlich begrenzten Bereich entlang der Mittellinie zwischen den beiden Sinushörnern gefunden. Im Verlauf der Ablösung der proepikardialen Zellvesikel bis ED 10.5 traten die Expressionen von Bmp2 und Bmp4 an der Grenze zwischen der ventralen Wand des Sinus venosus und den sich entwickelnden Vorhöfen auf (Abb. 15C, D, F, G, F'; Abb. 16C, D, F, G, F'). Im Gegensatz zu den Befunden im Hühnerembryo ließ sich also keine Bmp4-Expression innerhalb des Proepikards der Mausembryonen erkennen.

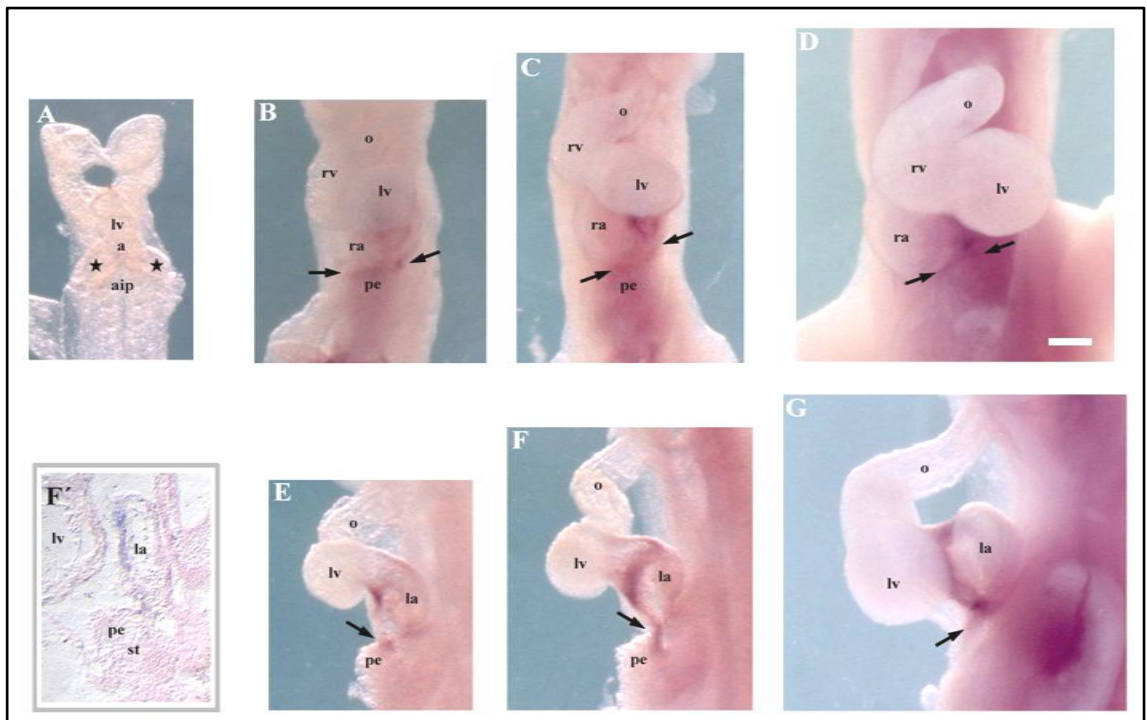


Abb. 15. Expression von Bmp2 am venösen Pol des embryonalen Mausembryos an ED 8.5 (A), ED 9.0 (B, E), ED 9.5 (C, F, F') und ED 10.5 (D, G). Ventrale (A-D) und laterale (E-G) Ansichten von Herzen nach einer *Whole mount*-ISH mit Bmp2-RNA-Sonden. Die zusätzliche Abbildung (F') zeigt die Bmp2-Expression in einem sagittalen histologischen Schnitt von einem Herz an ED 9.5. An ED 8.5 wird Bmp2 nur schwach im Gebiet des zukünftigen Sinus venosus (markiert mit Sternchen) exprimiert. Zwischen ED 9.0 und ED 10.5 wird Bmp2 in der ventralen Wand des Sinus venosus kranial zum Gebiet, in dem sich das Proepikard bildet, exprimiert. Pe, Proepikard; st, Septum transversum. Sonstige Abkürzungen gemäß Abb. 10. Maßstabsbalken = 200 µm.

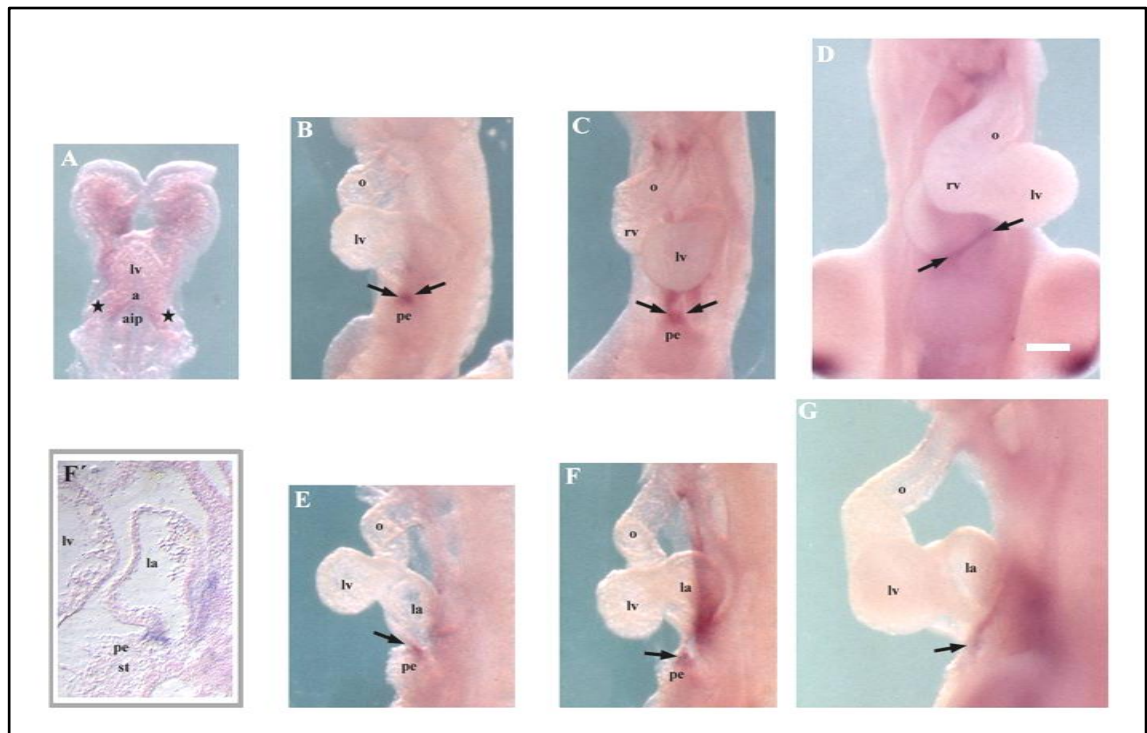


Abb. 16. Expression von Bmp4 am venösen Pol des embryonalen Mausembryos an ED 8.5 (A), ED 9.0 (B, E), ED 9.5 (C, F, F') und ED 10.5 (D, G). Ventrale (A-D) und laterale (E-G) Ansichten von Herzen nach einer *Whole mount*-ISH mit Bmp4-RNA-Sonden. Die zusätzliche Abbildung (F') zeigt die Bmp4-Expression in einem sagittalen histologischen Schnitt von einem Herz an ED 9.5. An ED 8.5 wird Bmp4 in bilateral symmetrischen Gebieten medial zur Region des zukünftigen Sinus venosus (markiert mit Sternchen) exprimiert. An ED 9.0 und ED 9.5 wird Bmp4 (markiert mit Pfeilen) im Sinus venosus in einem Gebiet in der Mittellinie kranial des Gebiets, in dem sich das Proepikard bildet, exprimiert. Pe, Proepikard; st, Septum transversum. Sonstige Abkürzungen gemäß Abb. 10. Maßstabsbalken = 200 µm.

4.1.1. Lagebeziehungen zwischen dem Proepikard und benachbarten Geweben im Hühner- und Mausembryo

Die beiden Proepikardanlagen im Hühnerembryo zeigen nicht nur Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten, sondern auch unterschiedliche Beziehungen zu ihnen benachbarten Geweben. Diese Unterschiede bilden sich interessanterweise erst kurz vor der Entwicklung der proepikardialen Zotten aus. Sie sind auf eine Besonderheit der Entwicklung des Hühnerembryos zurückzuführen. Bis zum HH-Stadium 12 liegt der Hühnerembryo mit seiner ventralen Körperhälfte auf dem Dottersack. Aufgrund des primären Fehlens einer ventralen Perikardwand liegen die späteren Proepikardanlagen gegenüber dem Dottersackmesoderm. In diesem Stadium haben sich noch keine morphologisch erkennbaren proepikardialen Anlagen gebildet. Der C-förmige

Herzschlauch ist bereits nach rechts verlagert. Im HH-Stadium 13 beginnt sich der Kopf nach rechts zu drehen, der Rumpf folgt dieser Bewegung mit einer leichten Rotation. Im HH-Stadium 14 ist der Embryo bereits so weit nach rechts um die kraniokaudale Körperachse rotiert, dass sich die gesamte rechte Seite des Embryos mit der rechten Proepikardanlage vom Dottersack entfernt hat, während sich die linke Anlage weiterhin gegenüber dem Dottersack befindet. Der Herzschlauch durchläuft Prozesse des *Cardiac loopings* und verlagert sich dabei in kaudale Richtung, so dass sich das Kammermyokard gegenüber der rechten Hälfte des Sinus venosus befindet. Zeitgleich beginnen sich die Zotten der rechten proepikardialen Anlage zu bilden (Abb. 17A, B).

Mausembryonen besitzen bereits primär eine ventral geschlossene Perikardhöhle. Im Mausembryo befinden sich die beiden proepikardialen Anlagen somit niemals direkt gegenüber dem Dottersack. Beide Proepikardanlagen entwickeln sich in ungefähr dem gleichem Abstand gegenüber dem Kammermyokard (Abb. 17C, D).

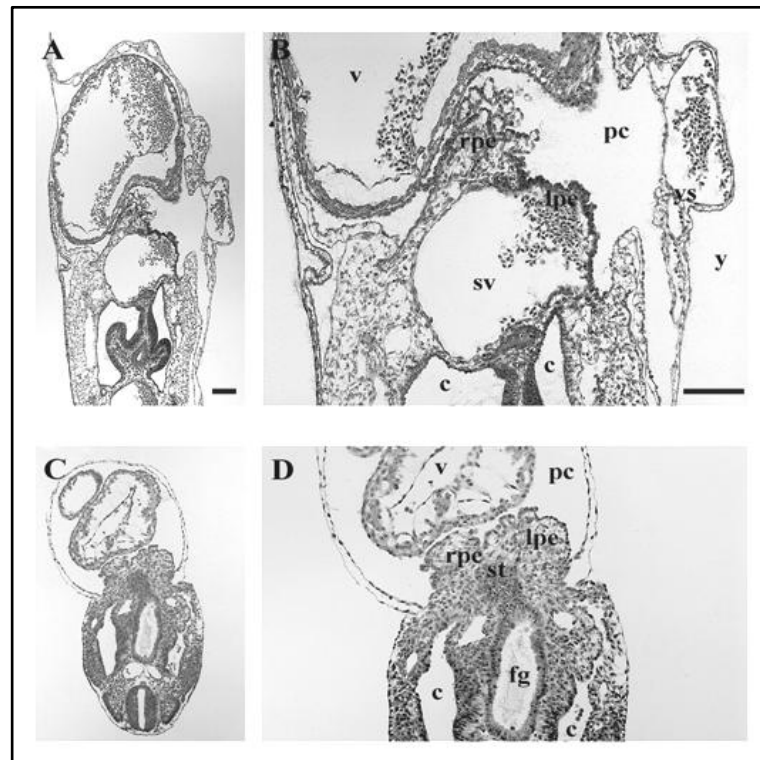


Abb. 17. Speziesspezifische Unterschiede in den topographischen Beziehungen der beiden proepikardialen Anlagen. Transverse histologische Schnitte von normalen Hühnerembryonen (A, B; HH-Stadium 17) und Mausembryonen (C, D; ED 9.5). **A, B:** Im Hühnerembryo liegt das rechte Sinushorn mit der rechten proepikardialen Anlage normalerweise gegenüber der myokardialen Oberfläche der primitiven Ventrikel, wohingegen sich die linke Anlage gegenüber dem Dottersack befindet. **C, D:** Im Mausembryo liegen beide Proepikardanlagen niemals direkt gegenüber dem Dottersack und beide

entwickeln sich gegenüber der myokardialen Oberfläche der primitiven Ventrikel. c, peritonealer Anteil der Zölmhöhle; fg, Vorderdarm; lpe, linke proepikardiale Anlage; pc, perikardialer Anteil der Zölmhöhle; rpe, rechte proepikardiale Anlage; st, Septum transversum mit der Leberanlage; sv, Sinus venosus; v, primitiver Ventrikel; ys, Dottersack; y, Dotter. Maßstabsbalken = 200 µm.

4.2. Teil 2: Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo nach experimentellen Änderungen der topographischen Beziehungen der Proepikardanlagen zum Dottersackmesoderm und dem Kammermyokard

Die Beobachtung, dass sich normalerweise nur die rechte Proepikardanlage im Hühnerembryo heranreift, wirft die Frage auf, über welche Signalmechanismen eine rechtsseitige Stimulation bzw. die linksseitige Repression der Proepikardentwicklung reguliert werden. Die zeitliche Beziehung zwischen der rechtsseitigen Rotation der Körperachse und der daraus resultierenden topographischen Nähe der beiden asymmetrisch gebildeten Anlagen zum Dottersackmesoderm bzw. dem Kammermyokard lässt vermuten, dass diese Gewebe einen inhibitorischen (Dottersackmesoderm) bzw. induzierenden (Kammermyokard) Einfluss auf ihre Entwicklung haben könnten. Diese Hypothese wurde in den beiden folgenden Experimenten geprüft.

4.2.1. Mechanisch induzierte Inversion der Körperrotation in der *Whole embryo*-Kultur

Um zu prüfen, ob die asymmetrische Entwicklung der Proepikardanlagen auf die unterschiedlichen topographischen Beziehungen zu den oben genannten möglichen Proepikard induzierenden (Kammermyokard) bzw. hemmenden (Dottersackmesoderm) Geweben zurückzuführen ist, wurden mechanisch induzierte Inversionen der Körperrotation in *Whole embryo*-Kulturen durchgeführt.

Im HH-Stadium 12 wurden zunächst *Whole embryo*-Kulturen angelegt (siehe 3.2.11.1). Die ventrale Seite des Embryos war somit für Manipulationen zugänglich. Mit einer stumpfen Pinzette wurde der C-förmige, nach rechts geneigte Herzschlauch auf die linke Seite geklappt. Aufgrund des geringen Flüssigkeitsvolumens über dem Embryo wurde der Herzschlauch durch die Oberflächenspannung auf der linken Seite gehalten (Abb. 18B). Diese Art der Manipulation ist *in ovo* nicht möglich, ein derartig

manipulierter Herzschlauch würde aufgrund der fehlenden Oberflächenspannung wieder in seine ursprüngliche Lage zurückklappen.

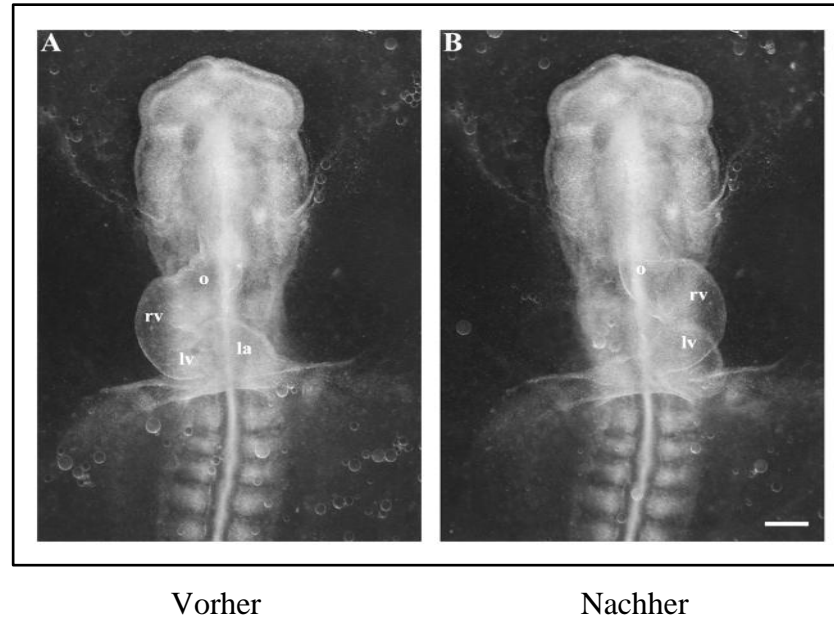


Abb. 18. Vergleich der Lage des Herzschlauchs im Hühnerembryo vor (A) und nach (B) mechanisch induzierter Inversion des Herzschlauchs im HH-Stadium 12. In einem normal entwickelten Embryo befindet sich der Herzschlauch auf der rechten Seite (A). Nach der Manipulation ist der Herzschlauch zur linken Seite verlagert (B). Durch das geringe Flüssigkeitsniveau in der *Whole embryo*-Kultur wird der verlagerte Herzschlauch auf der linken Seite gehalten. la, linkes Atrium; lv, linker Ventrikel; o, Ausflussbahn; rv, rechter Ventrikel. Maßstabsbalken = 200 μ m.

Innerhalb der folgenden 24-stündigen Inkubationszeit bis ungefähr zum HH-Stadium 16/17 wurde in allen manipulierten Embryonen ($n = 12$) aufgrund des nach links verlagerten Herzschlauchs eine Inversion der Körperrotation erzielt. Die kraniale Hälfte des Embryos war demnach ebenfalls auf die linke Seite gedreht. Konsequenterweise befand sich die linke Proepikardanlage daher nun gegenüber dem Kammermyokard und die rechte Anlage gegenüber dem Dottersackmesoderm (Abb. 19). In den Kontroll-experimenten, in denen *Whole embryo*-Kulturen ohne eine mechanisch induzierte Inversion der Körperrotation inkubiert wurden, konnte bei allen Embryonen ($n = 10$) eine normale rechtsseitige Körperrotation beobachtet werden.

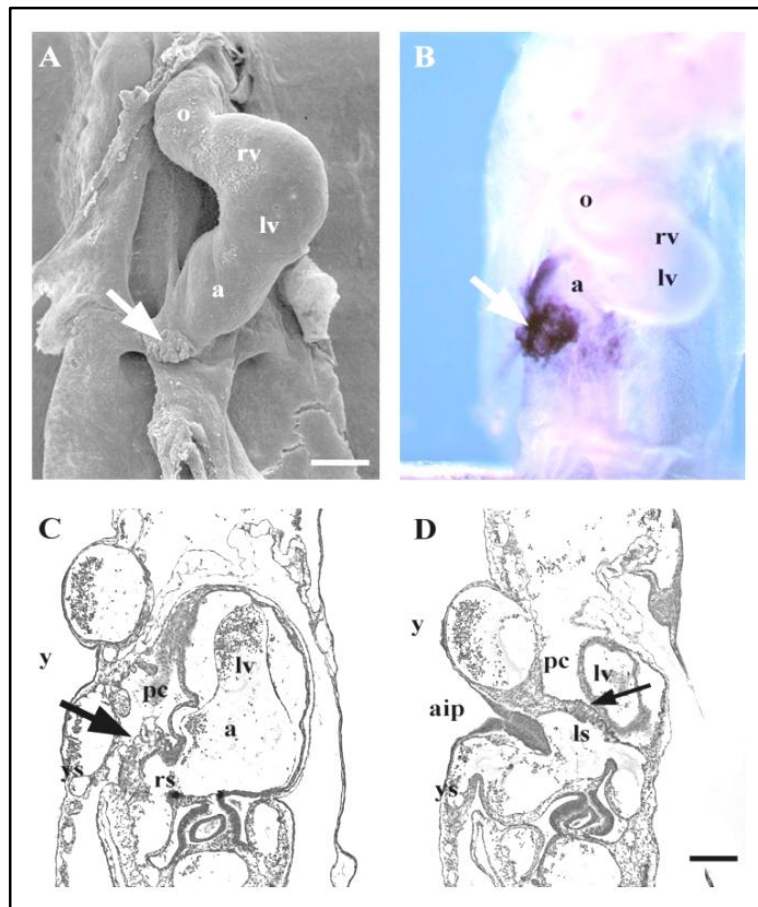


Abb. 19. Bildung des Proepikards im Hühnerembryo nach einer mechanisch induzierten Inversion des Herzschlauchs und der daraus resultierenden Inversion der Körperrotation in der rasterelektronischen Darstellung (A), nach einer *Whole mount* ISH mit dem proepikardialen Marker Tbx18 (B) und in transversen histologischen Schnitten (C, D). Nach einer 24-stündigen Inkubation der *Whole embryo*-Kultur zeigten die manipulierten Embryonen (HH-Stadien 16/17) eine Inversion der normalen topographischen Beziehungen der beiden Proepikardanlagen. Die rechte proepikardiale Anlage (markiert mit großem Pfeil) entwickelte sich gegenüber dem Dottersack (C) und die linke Anlage (markiert mit kleinem Pfeil) gegenüber dem ventrikulären Myokard (D). In diesem Experiment entwickelten alle Embryonen das normale proepikardiale Muster. a, primitives Atrium; aip, anteriore Darmpforte; rs, rechtes Sinushorn; ls, linkes Sinushorn; pc, perikardialer Anteil der Zölmhöhle; y, Dotter; ys, Dottersack. Maßstabsbalken = 200 µm.

In der rasterelektronen- und lichtmikroskopischen Beurteilung zeigte sich, dass sich in den manipulierten Embryonen beide proepikardialen Anlagen im normalen Muster entwickeln. Ebenso entsprachen die Expressionsmuster von Tbx18 denen der Kontrollpräparate (Abb. 19B). Während die rechte Anlage stets voll entwickelt war, blieb die linke Anlage in einem rudimentären Zustand (Abb. 19A, B).

In transversen histologischen Paraffinschnitten der mechanisch invertierten Embryonen konnte gezeigt werden, dass sich das rechte Proepikard gegenüber dem stark vaskularisierten Dottersackmesoderm befand (Abb. 19C). Die Mesothelzotten waren deutlich gewachsen, das Proepikard hatte sich zum reifen Phänotyp entwickelt. Die linke Anlage, die sich gegenüber dem Kammermyokard gebildet hatte, war hingegen nur wenig ausgeprägt (Abb. 19D).

4.2.2. Die Proepikardentwicklung in der Organkultur

In einem weiteren Experiment wurde die Entwicklung der Proepikardanlagen isoliert von den möglicherweise Proepikard induzierenden (Kammermyokard) bzw. hemmenden (Dottersackmesoderm) Geweben in Organkulturen untersucht. Dazu wurde aus einem Hühnerembryo im HH-Stadium 12 ein Gewebestück entnommen und auf ein rechteckiges Stück Schalenmembran geheftet (siehe 3.2.11.3). Dabei wurde der Gewebestück in kraniokaudaler Richtung aufgespannt, was zur Folge hatte, dass das Kammermyokard des Herzens nach kranial verlagert wurde. Gleichzeitig wurde das Dottersackmesoderm nach kaudal umgeklappt. Der Vorteil des Experiments ist demnach die räumliche Isolierung der proepikardialen Anlagen von den zu untersuchenden benachbarten Geweben.

Die rasterelektronen- und lichtmikroskopische (nach *In situ*-Hybridisierung mit Tbx18) Analyse nach der 24-stündigen Inkubation ergab, dass in allen untersuchten Organkulturen (n = 5) wiederum rechts ein deutliches Wachstum der proepikardialen Zotten erfolgt war, während sich das linke Proepikard nur rudimentär entwickelt hatte (Abb. 20B, C; Abb. 21B). Die Expression von Tbx18 im rechten Proepikard war sehr viel ausgeprägter als die der linken Anlage (Abb. 21B) und entsprach damit den Expressionsmustern der Kontrollembryonen (Abb. 21A). Ebenfalls gut erkennbar war die kraniale Verlagerung des Herzschlauchs, wodurch das rechte Proepikard eine große Distanz zum ventrikulären Anteil des Herzschlauchs erhielt (Abb. 20A, B; Abb. 21B).

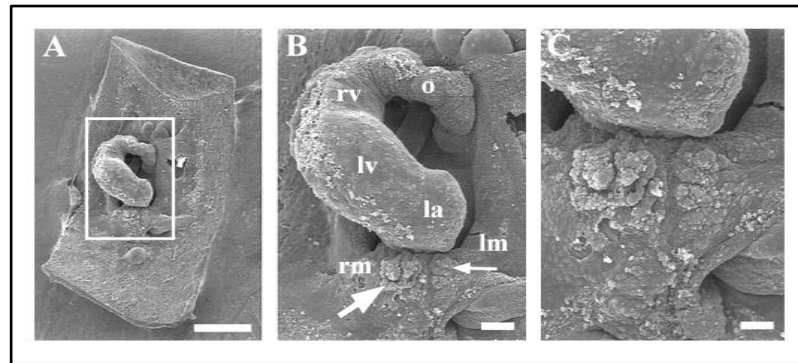


Abb. 20. Rasterelektronische Darstellung des Proepikards in der Organkultur. Ventrale Ansichten eines embryonalen Hühnerherzens (explantiert im HH-Stadium 12) nach einer 24-stündigen Inkubation in der Organkultur. **A:** Gering vergrößerte Darstellung eines Herzens auf der Schalenmembran. **B:** Höhere Vergrößerung der umrandeten Region aus A. Der große Pfeil markiert die rechte Proepikardanlage, der kleine Pfeil deutet auf die linke Anlage. **C:** Stark vergrößerte Ansicht der rechten und linken Anlagen, die sich auf der ventralen Wand des Sinus venosus befinden. In allen kultivierten Herzen dieses Experiments bildete sich das Proepikard entsprechend dem normalen Entwicklungsmuster. Abkürzungen gemäß Abb. 9. Maßstabsbalken = 500 μm (A), 100 μm (B) und 50 μm (C).

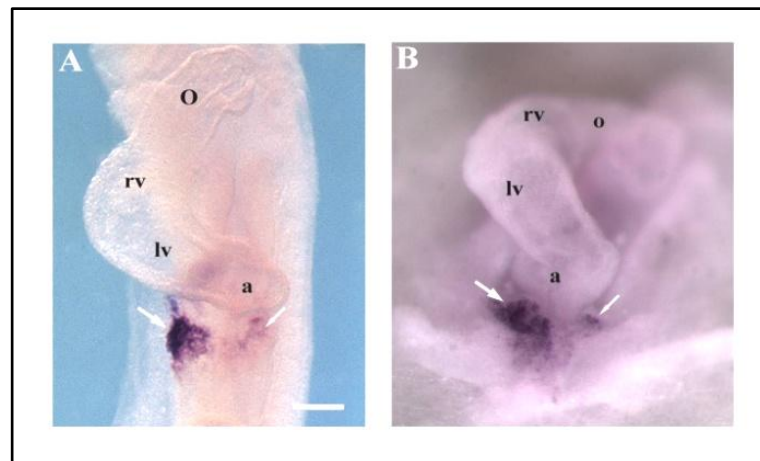


Abb. 21. *In situ*-Hybridisierung mit dem proepikardialen Marker Tbx18 eines normal entwickelten Hühnerembryos (**A**) und einer Organkultur (**B**). Die großen Pfeile deuten auf die rechte proepikardiale Anlage, die kleinen Pfeile zeigen die linke Anlage. Das Entwicklungsmuster der Proepikardanlagen in der Organkultur entspricht dem Entwicklungsmuster im normalen Embryo. Abkürzungen gemäß Abb. 10. Maßstabsbalken = 200 μm .

4.3. Teil 3: Entwicklung von experimentellen Verfahren zur Testung der direkten Steuerung durch rechts/links-seitenspezifische Signale

Das Ziel der 3. Teilstudie war die Entwicklung von experimentellen Verfahren, bei denen Faktoren, die eine mögliche Proepikard induzierende oder hemmende Wirkung besitzen, unilateral im Bereich des Sinus venosus appliziert werden könnten. Aufbauend auf dem oben genannten Befund, dass sich das Proepikard im Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen Muster bildet (siehe 4.1), war es theoretisch möglich, identifizierte Kandidaten, die eine asymmetrische Expression in den Proepikardanlagen zeigen, in der linken proepikardialen Anlage auf ihre induzierende Wirkung bzw. in der rechten Anlage auf ihren hemmenden Einfluss zu testen.

Für die Entwicklung der Testverfahren war der Faktor Bmp4 aufgrund seiner asymmetrischen Expression im Proepikard des Hühnerembryos geeignet. Bereits in vorhergehenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Bmp-Signalfaktoren eine wichtige Rolle in der Regulation des Proepikards spielen (Kruithof, 2006; Schlueter et al., 2006). Da lediglich Bmp2 in rekombinanter Form vorhanden war und dieser Faktor *in vitro* eine sehr ähnliche Wirkung wie Bmp4 zeigt, wurde er für die Entwicklung der experimentellen Verfahren eingesetzt.

4.3.1. 1. Testverfahren: Applikation Faktoren beladener Trägermaterialien in *Whole embryo*-Kulturen

Zunächst erfolgten die Applikationen von Bmp2 exprimierenden Zellaggregaten und faktorenbeladener Trägerperlen in *Whole embryo*-Kulturen. Dazu wurden von Embryonen des 3. Bebrütungstages *Whole embryo*-Kulturen angelegt (siehe 3.2.11.1). Durch diese Kulturmethode war der ventrale Teil mit dem Herzen des Embryos für Manipulationen zugänglich. Es zeigte sich, dass für diese Experimente nur Embryonen im HH-Stadium 12 verwendet werden konnten. Bei jüngeren Embryonen war die Sterblichkeits- und Fehlbildungsrate hoch, weswegen junge Embryonen ungeeignet waren. Bei älteren Embryonen war die Wahrscheinlichkeit, dass die Proepikard-induktion bereits ausgelöst war, zu hoch.

Die Applikation der Zellaggregate bzw. Trägerperlen erfolgte am venösen Pol der Herzen direkt ins Lumen des rechten oder linken Schenkels des Sinus venosus unterhalb

der proepikardialen Serosa. Der Vorteil dieses Verfahrens war, dass die Manipulationen von ventral erfolgen konnten, dies ist grundsätzlich in diesem Entwicklungsstadium *in ovo* nicht möglich. Es zeigte sich leider, dass die Trägerperlen oder Zellaggregate teilweise nach einiger Zeit durch den Blutfluss in die Vorhofsebene oder bis in den Ventrikelbereich des Herzschlauchs verlagert wurden. Zum anderen wurden die Faktoren, die an die Trägerperlen gebunden waren, durch den Flüssigkeitsstrom kontinuierlich ausgewaschen. Dadurch verteilten sich die Faktoren innerhalb des Embryos und der Kulturschale, so dass die restliche Menge der entsprechenden Faktoren auf dem Trägermaterial nicht mehr ausreichend war, um eine Wirkung hervorzurufen.

4.3.2. 2. Testverfahren: Applikation Faktoren beladener Trägermaterialien in Organkulturen

Die oben genannten Probleme in der *Whole embryo*-Kultur führten zum Einsatz eines anderen Kultursystems, der Organkultur, das aufgrund der fehlenden Blutströmung geeigneter erschien. Wie sich zeigte, konnten für die Implantationsversuche in Organkulturen nur Embryonen im HH-Stadium 12/13 verwendet werden, da durch die kulturbedingte Entwicklungsverzögerung in jüngeren Embryonen nach 24-stündiger Inkubation kein proepikardialer Phänotyp erreicht werden konnte. Eine längere Kultivierung war in diesem System jedoch nicht möglich, da die Gewebezersetzung mit fortschreitender Inkubationsdauer zunahm. Ein Gewebekblock, der im HH-Stadium 12/13 entnommen wurde, erreichte nach 24-stündiger Kultivierung etwa die Morphologie eines entsprechenden Ausschnitts eines HH-Stadium 16/17-Embryos, wodurch eine Beurteilung des proepikardialen Phänotyps möglich war.

Die Trägerperlen wurden wie in den *Whole embryo*-Kulturen in die großen Gefäße des Sinus venosus unterhalb der sich später ausbildenden Proepikardanlagen implantiert (siehe 3.2.11.4.2). Leider zeigte sich bereits in den Kontrollversuchen, dass das Gewebe oberhalb der Beads nekrotisch wurde und abstarb. Aufgrund der beschriebenen technischen Probleme war auch der Einsatz der Organkulturen nicht geeignet, um die Proepikard induzierenden bzw. hemmenden Faktoren zu untersuchen.

4.3.3. 3. Testverfahren: Proepikardiale Gewebekulturen

Um die technischen Probleme der Implantationsverfahren zu umgehen, wurden Gewebekulturen von Sinusgewebe von Embryonen im HH-Stadium 12 angelegt. In diesen Kulturen war es theoretisch möglich, eine Induktion der linken proepikardialen Anlage bzw. eine Hemmung der rechten Anlage durch die Zugabe identifizierter Kandidaten wie Bmp2/4 (siehe 4.3) zum Medium zu erreichen. Leider zeigten bereits die Kontrollversuche, dass sich in dieser Gewebekultur kein proepikardialer Phänotyp entwickelte. Dieses experimentelle Verfahren war daher ebenfalls für die Untersuchung Proepikard induzierender bzw. hemmender Kandidaten ungeeignet.

4.4. Teil 4: Entwicklung des koronaren Lymphgefäßsystems

Die Koronargefäße des adulten Hühnerherzens werden von Lymphgefäßen begleitet. Über den Ursprung des koronaren Lymphgefäßsystems konnten bislang keine Aussagen gemacht werden (siehe 2.5.4.5). Die Entwicklung des kardialen Lymphgefäßsystems wurde bislang nur unzureichend durch Injektionsexperimente mit Latex dokumentiert (Rychter et al., 1971; Klika, 1972). Aufgrund der großen Nähe zwischen den koronaren Blutgefäße und ihren begleitenden Lymphgefäßen stellte sich die Frage, ob das koronare Lymphgefäßsystem ebenfalls ein Derivat des Proepikards ist.

4.4.1. Darstellung des koronaren Lymphgefäßsystems mit dem Lymphendothelmarker Prox1

Es war bereits bekannt, dass Lymphgefäße im embryonalen Hühnerherzen ab dem 8. Bebrütungstag nachgewiesen werden können (Rychter et al., 1971; Klika, 1972). Zur Darstellung der Lymphgefäßentwicklung, wurden in dieser Arbeit immunhistochemische Untersuchungen mit einem Lymphendothel spezifischen polyklonalen Prox1-Antikörper an *Whole mount*-Präparaten durchgeführt. Dazu wurden die Herzen von Hühnerembryonen des 10. Bebrütungstags explantiert und fixiert. Es wurden sowohl eine indirekte immunhistochemische Methode als auch das wesentlich sensitivere PAP-Verfahren angewendet (siehe 3.2.9.1). Die Ergebnisse waren heterogen und teilweise schwer zu deuten. Ein wesentlicher Grund dafür war, dass der polyklonale Prox1-Antikörper neben der gewünschten Markierung von Lymphendothelzellen auch

eine besonders starke Affinität gegenüber Myokardzellen aufweist. Dies führte stets zu einer deutlichen Hintergrundfärbung des Myokards, die die Anfärbung der Lymphendothelien meist überlagerte.

Dennoch gelang bei einigen Herzen in den HH-Stadien 34/35 die Dokumentation feiner Lymphendothelnetze. So konnte in einer immunhistochemischen Reaktion gezeigt werden, dass die angefärbten Lymphendothelzellkerne im Bereich der pulmonalen Klappenebene der Ventrikelbasis lokalisiert sind und sich von dort in kaudaler Richtung zur Herzspitze ausbreiten (Abb. 22A, B).

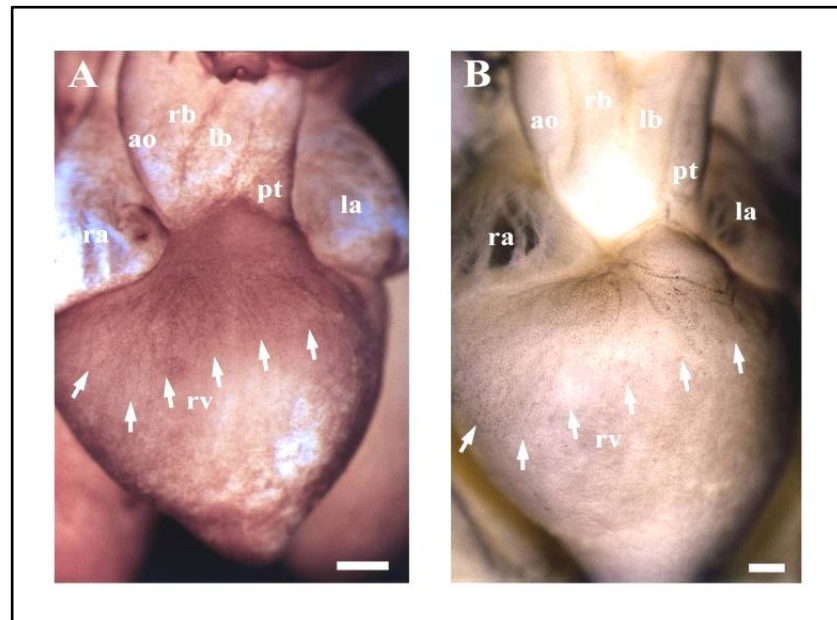


Abb. 22. Immunhistochemische Darstellung des koronaren Lymphgefäßsystems im Hühnerembryo (HH-Stadium 34/35) mit dem Lymphendothelmarker Prox1. Ventrale Ansicht embryonaler Hühnerherzen. ao, Aorta; la, linker Vorhof; lb, linke Arteria brachiocephalica; pt, Pulmonararterie; ra, rechter Vorhof; rb, rechte Arteria brachiocephalica; rv, rechter Ventrikel. Maßstabsbalken = 250 µm.

Die Ausbreitung des feinen Netzes war gleichmäßig über die Herzbasis verteilt. In einer anderen immunhistochemischen Reaktion konnten die Lymphgefäße besonders am rechten Ventrikel unterhalb der Herzbasis und an den großen Gefäßen, speziell an der Aorta und der rechten Arteria brachiocephalica nachgewiesen werden (Abb. 23A, B).

Die dünnen Lymphgefäße befanden sich im Bereich der Ventrikel Ebene und verliefen in kaudaler und lateraler Richtung zur dorsalen Seite des Herzens.

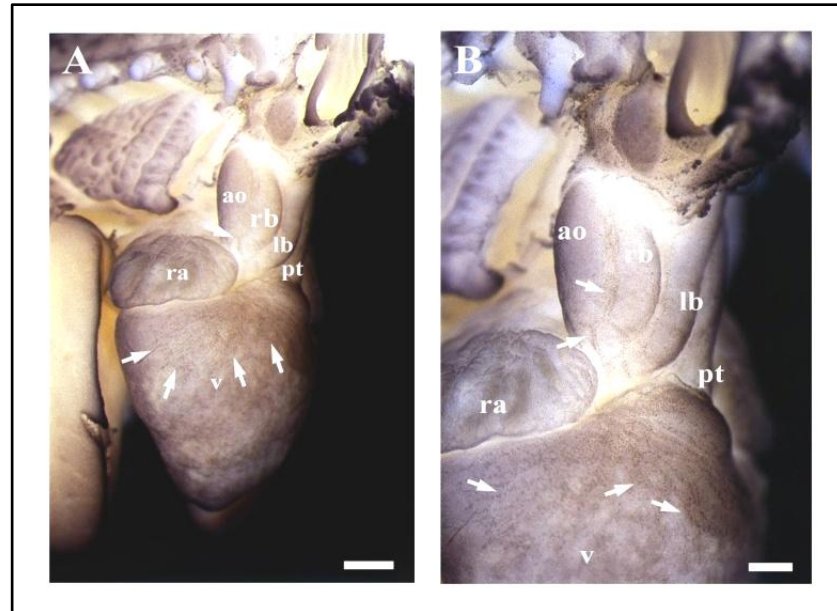


Abb. 23. Immunhistochemische Darstellung des koronaren Lymphgefäßsystems im Hühnerembryo mit dem Lymphendothelmarker Prox1. Rechte laterale Ansichten eines embryonalen Hühnerherzens im HH-Stadium 35. ao, Aorta; la, linker Vorhof; lb, linke Arteria brachiocephalica; pt, Pulmonararterie; ra, rechter Vorhof; rb, rechte Arteria brachiocephalica; v, Ventrikel. Maßstabsbalken = 500 μ m (A); 250 μ m (B).

Es konnte bestätigt werden, dass der Lymphendothelmarker Prox1 in immunhistochemischen Untersuchungen spezifisch reagierte. Allerdings war sein Einsatz an *Whole mount*-Färbungen weitestgehend ungeeignet, da die Hintergrundfärbung der Myokardzellen diese weitestgehend überlagerte.

Wie sich zeigte, war eine *In situ*-Hybridisierung mit einer Prox1-RNA-Sonde für eine *Whole mount*-Darstellung der koronaren Lymphgefäße ebenfalls ungeeignet, da hier wie in den meisten immunhistochemischen Experimenten die intensive Färbung des Myokards dominierte. Die Spezifität der RNA-Sonde konnte jedoch bestätigt werden, da die Endothelzellen der inneren, konkaven Seite der semilunaren Herzklappen eindeutig markiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten anhand der gelungenen immunhistochemischen Analysen mit dem Prox1-Antikörper die bisherigen Erkenntnisse der Injektionsversuche von Rychter et al. (1971) und Klika et al. (1972) über die Ausbreitung des koronaren Lymphgefäßsystems bestätigt werden. Da der Ursprung der Koronargefäß begleitenden Lymphgefäße jedoch anhand dieser Befunde noch nicht geklärt werden konnte, waren weiterführende Experimente notwendig.

4.4.2. Erzeugung von Wachtel/Huhn-Chimären zur Klärung der Frage, ob proepikardiale Vorläuferzellen an der Entwicklung des koronaren Lymphgefäßsystems beteiligt sind

Eine geeignete Methode war die Erzeugung von Wachtel/Huhn-Chimären und eine anschließende immunhistochemische Doppelfärbung mit dem Lymphendothelmarker Prox1 und dem wachtelspezifischen Antikörper QH1. Das verwendete Verfahren zur Erzeugung von Wachtel/Huhn-Chimären war bereits von Männer (1999) etabliert (siehe 3.2.11.5). Hierbei wurde in einem Transplantationsexperiment ein Wachtelproepikard homotop in die Region des Sinus venosus des Hühnerembryos im HH-Stadium 16 eingebracht. Gleichzeitig wurde die Ausbildung der sekundären Gewebebrücke des Hühnerproepikards zum ventralen Kammermyokard mechanisch durch das verwendete Trägermaterial des Wachteltransplantats verhindert.

Nach einer Bebrütungsdauer von insgesamt 15 Tagen wurden die Herzen von fünf Wachtel/Huhn-Chimären fixiert und in Kooperation mit Frau K. Buttler aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. J. Wilting, Göttingen, Gefrierschnitte mit einer Dicke von 16-20 µm einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung mit dem Wachtelendothel spezifischen Antikörper QH1 (Pardanaud et al., 1987) und dem Lymphendothel spezifischen polyklonalen Prox1-Antikörper (Wilting et al., 2006) unterzogen. Die Ergebnisse stimmten in allen fünf Herzen überein. Wie schon vorher bekannt war (Mikawa und Gourdie, 1996; Männer, 1999), liefert das Proepikard in Vogelembryonen u. a. das Endothel der koronaren Blutgefäße. Dies konnte auch durch die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Wie in Abb. 24 und Abb. 25 gezeigt ist, war das Endothel der koronaren Blutgefäße QH1-positiv und Prox1-negativ. Im Gegensatz dazu waren die Lymphgefäße des subepikardialen Mesenchyms im Bereich der Herzbasis und den großen Gefäßstämmen Prox1-positiv, aber QH1-negativ, sie

enthielten also keine Lymphendothelzellen, die vom Wachtelproepikard stammten (Abb. 24; Abb. 25).

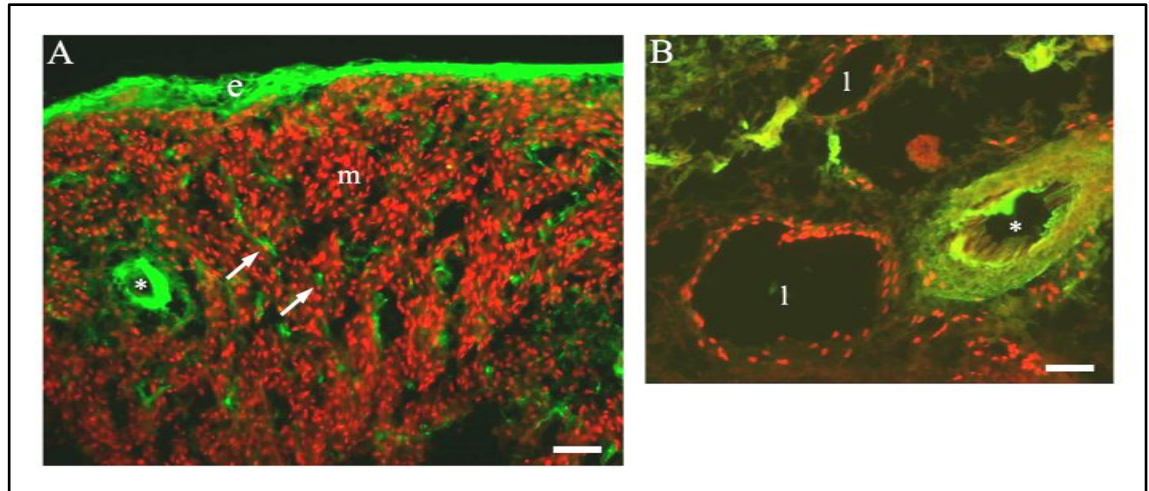


Abb. 24. Homotope Transplantation des Proepikards eines Wachtelembryos in einen altersentsprechenden Hühnerembryo. Nach einer Reinkubation bis zum 15. Bebrütungstag und einer Doppelfärbung mit QH1- (grün) und Prox1-Antikörpern (rot). (A) Das Epikard wird vom Proepikard der Wachtel geliefert (QH1-positiv), ebenso wie die kardialen Fibroblasten (Pfeile). Die Kardiomyozyten sind ebenfalls Prox1-positiv. (A, B) Die Blutgefäße im Myokard stammen ebenfalls von der Wachtel (markiert mit Sternchen; QH1-positiv). (B) Die Lymphgefäße begleiten die koronaren Blutgefäße, stammen jedoch vom Wirtsembryo, dem Huhn (Prox1-positiv, QH1-negativ). l, Lymphgefäß; e, Epikard; m, Myokard. Maßstabsbalken = 90 µm (A); 60 µm (B).

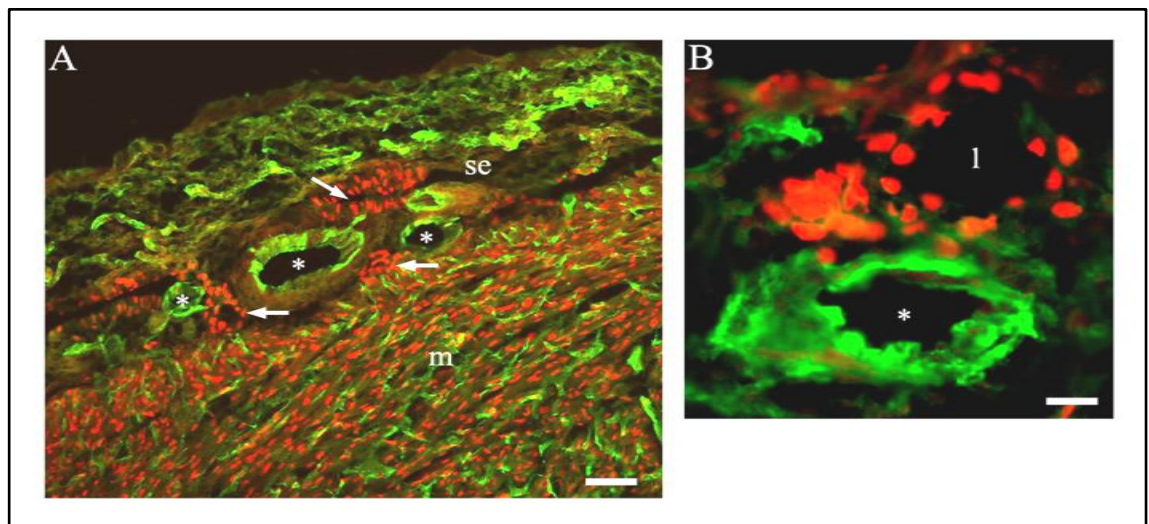


Abb. 25. Fluoreszenzdoppelfärbung mit QH1- (grün) und Prox1-Antikörpern (rot). (A, B) Die Blutgefäße im Subepikard (se) stammen von der Wachtel (markiert mit Sternchen, QH1-positiv). Die Lymphgefäße (Pfeile) sind Prox1-positiv und QH1-negativ, sie stammen nicht vom Wachtelproepikard. l, Lymphgefäß; m, Myokard. Maßstabsbalken = 90 µm (A); 30 µm (B).

Es gab jedoch eine Ausnahme auf Höhe der Herzbasis, wo sich ein großes lymphatisches Sammelgefäß befand, das eine kleine Anzahl an QH1-positiven Zellen aufwies (Abb. 26).

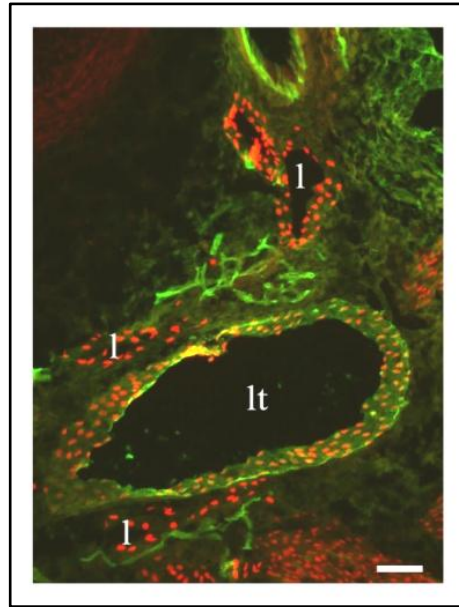


Abb. 26. Großes lymphatisches Gefäß (lt) an der Herzbasis. Dies ist das einzige lymphatische Gefäß, das eine kleine Zahl an QH1-positiven Wachtelendothelzellen zeigt. l, Lymphgefäß. Maßstabsbalken = 90 μ m.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte der Induktion und Differenzierung des Proepikards im Hühnerembryo analysiert. Hierbei wurden vier Teilstudien durchgeführt. Bei der ersten Teilstudie handelte es sich um deskriptive morphologische Untersuchungen und Expressionsstudien, die klären sollten, wie sich das Proepikard im Hühner- und Mausembryo entwickelt. Wie sich herausstellte, bildet sich das Proepikard im Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen Muster, während sich das Proepikard im Mausembryo bilateral symmetrisch entwickelt.

Der zweite Teil der Arbeit, der auf den oben genannten Daten basiert, behandelte die Frage, ob die bilateral asymmetrische Entwicklung der Proepikardanlagen beim Hühnerembryo direkt durch Signale, die mit den in Abschnitt 2.4 genannten Rechts/Links-Signalkaskaden verknüpft sind, gesteuert wird oder durch Signale, die nicht direkt mit diesen Signalwegen in Zusammenhang stehen. Letztgenannte Möglichkeit wurde durch den Befund nahegelegt, dass die beiden Proepikardanlagen sich im Hühnerembryo nicht nur unterschiedlich entwickeln, sondern auch unterschiedliche Beziehungen zu benachbarten Geweben zeigen. Die Prüfung einer direkten Steuerung durch seitenspezifische Signale konnte aufgrund fehlender experimenteller Techniken nicht erfolgen. Daher wurde lediglich die andere Möglichkeit geprüft: In zwei verschiedenen Experimenten wurde der mögliche Einfluss von Geweben getestet, von denen man aufgrund ihrer Lagebeziehungen zum Proepikard annehmen konnte, dass sie Proepikard induzierende bzw. hemmende Signale abgeben.

Aufbauend auf dem Befund, dass sich das Proepikard beim Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen Muster entwickelt, wurden im dritten Teil verschiedene experimentelle Verfahren zur Testung von Kandidaten, die eine Rolle in der Induktion und Inhibition der Proepikardentwicklung spielen könnten, entwickelt und auf ihre praktische Anwendbarkeit hin geprüft.

Der vierte Teil der Arbeit behandelt die Frage, ob sich proepikardiale Vorläuferzellen *in ovo* zu kardialen Lymphgefäßen differenzieren. Wie bekannt war, liefern die proepikardialen Vorläuferzellen wichtige Komponenten des adulten Herzens, namentlich das koronare Blutgefäßsystem und einen Großteil des kardialen

Bindegewebes. Die Herkunft des koronaren Lymphgefäßsystems war bislang nicht geklärt worden. Um die Ausbreitung der Lymphgefäße im embryonalen Hühnerherzen darstellen zu können, wurden zunächst Expressionsanalysen mit einem Lymphendothel markierenden Antikörper, der gegen Prox1 gerichtet ist, durchgeführt. In einem Experiment wurden proepikardiale Wachtel/Huhn-Chimären konstruiert, an denen immunhistochemische Doppelfärbungen mit Wachtelendothel und Lymphendothel spezifischen Antikörpern vorgenommen wurden, um zu prüfen, ob das Proepikard Vorläuferzellen für die koronaren Lymphgefäße liefert.

Im Folgenden werden die oben genannten Teile der Arbeit näher diskutiert.

5.1. Teil 1: Topogenese des Proepikards im Hühner- und Mausembryo

Die vorliegenden Befunde bestätigen Vermutungen, dass sich das Proepikard aus einer bilateral paarigen Anlage entwickelt (Muñoz-Chapuli et al., 1997; Männer et al., 2001; Schlueter et al., 2006). Diese Daten revidieren frühere Befunde, die suggerierten, dass es sich beim Proepikard um eine einzelne und unpaare Mittellinienstruktur handelt (Kurkiewicz, 1909; Viragh und Challice, 1981; Komiyama et al., 1987; Männer, 1992; Viragh et al., 1993). Die bilaterale Paarigkeit eines Organs lässt sich besonders leicht in Ventralansichten erkennen. Dies ist beim Proepikard nicht ohne weiteres möglich, da die Kammerschleife im Verlauf des *Cardiac looping* den Sinus venosus von ventral überdeckt und somit einen freien ventralen Blick auf den venösen Pol des Herzens verhindert. Das Proepikard wurde daher bisher meistens in Seitenansichten untersucht, was lediglich den Blick auf eine Proepikardanlage erlaubt. Der Hühnerembryo vollzieht während seiner Entwicklung eine Rotation um die kraniokaudale Körperachse. Dadurch wird die linke Seite des Embryos *in ovo* dem Blick des Betrachters entzogen, während die rechte Seite deutlich exponiert ist. Die schwach ausgeprägte linke Proepikardanlage wird daher in Seitenansichten leicht übersehen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass in vielen Studien nur das voll entwickelte Proepikard untersucht wurde. Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung lässt sich jedoch sowohl beim Hühner- als auch beim Mausembryo lediglich eine Ansammlung von proepikardialen Zotten erkennen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde der Proepikardentwicklung im Maus- und Hühnerembryo wurden durch eine neuartige Präparationstechnik ermöglicht. Um einen freien ventralen Blick auf den venösen Pol des Herzens mit den proepikardialen Anlagen zu erhalten, wurden die Embryonen in einem überstreckten Zustand nach Beseitigung der Torsion um die kraniokaudale Körperachse fixiert. Auf diese Weise konnte zum ersten Mal die Entwicklung der beiden Proepikardanlagen sowohl im Maus- als auch im Hühnerembryo über den gesamten Zeitraum ausgehend vom ersten morphologischen Auftreten bis zur Initialphase der Bildung des primitiven Epikards dokumentiert werden. Hierbei wurden grundlegende Unterschiede der Proepikardentwicklung zwischen den beiden Spezies beobachtet. Während sich im Mausembryo die beiden proepikardialen Anlagen gleichzeitig und symmetrisch an ED 8.5 entwickeln, bildet sich im Hühnerembryo zunächst im HH-Stadium 14 die rechte Anlage, bevor einige Stunden später im HH-Stadium 15/16 die linke Anlage erscheint. Weiterhin vereinigen sich die bilateral symmetrischen Anlagen im Bereich der embryonalen Mittellinie im Mausembryo und bilden so eine einzelne zusammenhängende proepikardiale Struktur, die an ED 9.5 das reife Proepikard darstellt. Beim Hühnerembryo hingegen bleiben die beiden Proepikardanlagen stets voneinander getrennt und fusionieren nicht. Es reift lediglich die rechte Proepikardanlage zum vollen proepikardialen Phänotyp heran, während die linke Anlage sich nicht weiter entwickelt und sich schließlich ganz zurückbildet. Die Entwicklung des Proepikards erfolgt demnach im Mausembryo in einem bilateral symmetrischen und im Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen Muster.

5.1.1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Topogenese des Proepikards und seinem Transfermechanismus?

Es stellt sich die Frage nach der entwicklungsbiologischen Relevanz der vorliegenden Befunde. Es gibt einen weiteren bereits gut bekannten Unterschied zwischen der Proepikardentwicklung im Maus- und Hühnerembryo: So erfolgt der Transfer der Vorläuferzellen vom Proepikard zum Herzen in beiden Spezies auf unterschiedliche Weise. Während im Hühnerembryo eine sekundäre Gewebebrücke gebildet wird, über die die Vorläuferzellen auf den primitiven Ventrikel gelangen (Männer, 1992; Männer et al., 2001; Nahirney et al., 2003), schnüren sich im Mausembryo Vesikel von der proepikardialen Anlage ab, die frei schwebend durch die geschlossene Perikardhöhle

zum Myokard gelangen (Komiyama et al., 1987; Kuhn und Liebherr, 1988; Männer et al., 2001). Da in diesem Prozess eine größere Anzahl der Zellaggregate verloren geht, könnte dieser Mechanismus weniger effektiv sein als der Transfer über eine Gewebebrücke. Diese Ineffektivität könnte in Säugerembryonen durch das bilateral symmetrische Auftreten von proepikardialen Anlagen und die daraus resultierende größere Anzahl an Vorläuferzellen kompensiert werden. Im Hühnerembryo könnte durch die einseitige Produktion an Vorläuferzellen die unnötige Bildung von übermäßig vielen Proepikardzellen verhindert werden. Diese Hypothese steht allerdings im Widerspruch zu Befunden im Hundshai. Dessen Embryonen produzieren freischwebende Zellvesikel anstelle einer sekundären Gewebebrücke (Muñoz-Chapuli et al., 1997; Männer et al., 2001). Sie haben jedoch nicht wie Mausembryonen bilateral symmetrische Proepikardanlagen, sondern zeigen ein bilateral asymmetrisches und asynchrones Entwicklungsmuster. Wie im Hühnerembryo entsteht die rechte Anlage vor der linken (Muñoz-Chapuli et al., 1997), die ebenfalls nicht die volle Reife erlangt (R. Muñoz-Chapuli, persönliche Mitteilung).

Es ist daher anzunehmen, dass die bilateral asymmetrische Ausbildung des Proepikards im Hühnerembryo weder mit dem Mechanismus der Zelltransfers verknüpft ist, noch eine einzigartige oder besondere Eigenheit von Vogelembryonen darstellt. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Entwicklungsmuster in solch phylogenetisch weit voneinander entfernten Spezies wie dem Hundshai und dem Hühnchen auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass die bilateral symmetrische Anlage des Proepikards ein evolutionär junges Muster darstellt, das für Säugerembryonen spezifisch ist.

5.2. Teil 2: Ist die Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo direkt mit der Spezifizierung der rechts- und linksseitigen Körperidentitäten verbunden?

Die inneren Organe der Vertebraten zeigen speziesspezifische morphologische und topographische Rechts/Links-Asymmetrien. Wie bekannt ist, wird die Ausbildung dieser Asymmetrien durch molekulare Signalkaskaden gesteuert, die bereits in frühen embryonalen Entwicklungsstadien die Spezifizierung der rechts- oder linksseitigen Körperidentitäten regulieren (siehe 2.4; für Reviews siehe Raya und Belmonte, 2004; Levin, 2005). Wie die vorliegenden Befunde zeigen, wurde mit der Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo eine weitere, bisher unbeachtete Rechts/Links-

Asymmetrie gefunden. Aufgrund der Tatsache, dass die bisher bekannten Rechts/Links-Asymmetrien innerer Organe durch rechts/links-seitenspezifische Signale gesteuert werden, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Rechts/Links-Asymmetrie des Proepikards durch diese Signale reguliert wird. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch noch eine andere Möglichkeit auf: Die Asymmetrie der Proepikardanlagen könnte auf den Einfluss benachbarter Gewebe wie Dottersackmesoderm und Kammermyokard zurückzuführen sein. Der Hühnerembryo beginnt am 3. Bebrütungs-tag nach rechts um die kraniokaudale Körperachse zu rotieren. Vor der Rotation befinden sich beide Proepikardanlagen gegenüber dem Dottersack und zeigen noch keine Ausbildung von mesothelialen Zotten. Im Verlauf der Rotation entfernt sich die rechte Proepikardanlage vom Dottersack und gelangt hinter den Kammerteil der Herzscheife, während die linke Anlage gegenüber dem Dottersackmesoderm bleibt. Aufgrund entwicklungsbedingter Unterschiede haben die embryonalen Ventrikel und das Dottersackmesoderm im Mausembryo eine andere Lagebeziehung zu den Proepikardanlagen. Im Mausembryo ist die Perikardhöhle zum Zeitpunkt der Proepikardentwicklung geschlossen. Die beiden Proepikardanlagen liegen demnach nie in direkter Nähe zum Dottersack. Außerdem befinden sich beide Proepikardanlagen gegenüber dem Kammermyokard des Herzschlauchs. Aufgrund dieser Befunde kann vermutet werden, dass das Kammermyokard möglicherweise einen induktiven und das Dottersackmesoderm einen hemmenden Einfluss auf die beiden proepikardialen Anlagen ausüben könnten.

Um zu prüfen, ob die Proepikardentwicklung direkt von Rechts/Links-Signalen abhängig ist, wäre es notwendig, die Entwicklung des Proepikards im Hühnerembryo nach einer Manipulation der Rechts/Links-Spezifizierung der Achsen zu analysieren. In den vergangenen Jahren wurden mehrere reproduzierbare Verfahren entwickelt, mit denen es möglich ist, vorhersagbare Veränderungen in der Spezifizierung der Rechts/Links-Körperidentität im frühen Hühnerembryo hervorzurufen. Diese Manipulationen werden in *Whole embryo*-Kulturen vor Erreichen der HH-Stadien 7/8 durchgeführt. Da es nicht möglich ist, derartig manipulierte Embryonen in der *Whole embryo*-Kultur vom HH Stadium 7/8 bis zum Erreichen der proepikardialen Reife im HH-Stadium 16 zu inkubieren, müssten derartige Manipulationen für die Prüfung der oben genannten Fragen *in ovo* durchgeführt werden. Derzeit sind jedoch keine Methoden bekannt, mit denen *in ovo* die Rechts/Links-Spezifizierung zuverlässig und

vorhersehbar verändert werden kann. Eine Beantwortung der Frage, ob die asymmetrische Proepikardentwicklung im Hühnerembryo direkt mit den bereits beschriebenen Rechts/Links-Signalkaskaden verbunden ist, kann demnach erst erfolgen, wenn dementsprechende Techniken etabliert wurden. Alternativ könnten experimentelle Überprüfungen der Frage, ob die Proepikardentwicklung durch Rechts/Links-Signale gesteuert wird auch in anderen Wirbeltierarten wie *Xenopus* oder dem Zebrafisch erfolgen, in denen derartige Manipulationen ohne den Einsatz spezieller Kulturverfahren direkt *in situ* möglich sind. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob die Proepikardentwicklung in diesen Spezies nach einem asymmetrischen oder symmetrischen Muster erfolgt.

Aus den oben genannten Gründen ist es derzeit nicht möglich zu prüfen, ob die asymmetrische Proepikardentwicklung im Hühnerembryo auf dem direkten Einfluss von Rechts/Links-Signalen beruht. Daher konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich geprüft werden, ob die asymmetrische Proepikardentwicklung durch Signale umliegender Gewebe kontrolliert wird. Wie bereits oben erwähnt wurde, wäre es denkbar, dass solche Signale vom Dottersackmesoderm bzw. vom Myokard der embryonalen Ventrikel ausgehen.

Hierzu wurden zwei Experimente durchgeführt. Im ersten Experiment wurden die topographischen Beziehungen der proepikardialen Anlagen zum Dottersack und Myokard durch eine mechanisch induzierte Inversion der Körperrotation vertauscht. Als Ergebnis dieses Experiments wäre zu erwarten gewesen, dass sich

- (A) die rechte proepikardiale Anlage nicht ausgebildet hätte, während die linke Anlage den reifen Phänotyp entwickelt (Myokard hat induzierenden, Dottersack reprimierenden Einfluss auf die Proepikardentwicklung) oder
- (B) das normale Entwicklungsmuster auftritt (Myokard und Dottersack haben keinen Einfluss auf die Proepikardentwicklung).

Im zweiten Experiment wurden Organkulturen angelegt, in denen sich die proepikardialen Anlagen physikalisch isoliert von den vermeintlich stimulierenden bzw. hemmenden Geweben entwickeln sollten. Als Ergebnis wäre hier zu erwarten gewesen, dass sich

- (A) keine der beiden Anlagen bildet (wenn das Myokard induzierend wirkt und der Dottersack keinen wesentlichen Einfluss hat),
- (B) beide Anlagen gleichmäßig heranreifen (Myokard hat keinen Einfluss, nur der Dottersack wirkt hemmend auf die Proepikardbildung) oder
- (C) das normale Entwicklungsmuster beobachtet wird (kein wesentlicher Einfluss durch Myokard und Dottersack).

In beiden Experimenten wurden die Manipulationen erst nach Abschluss der Etablierung der molekularen Rechts/Links-Identitäten durchgeführt, die zwischen HH-Stadium 5 und 8 stattfinden (Levin et al., 1995; Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998). Somit war sichergestellt, dass die experimentellen Ergebnisse nicht auf ein verändertes Rechts/Links-*Signaling* zurückzuführen waren.

Die Tatsache, dass die Entwicklung der beiden Proepikardanlagen in beiden Experimenten dem normalen Entwicklungsmuster entsprach, widerlegt die Hypothese, dass die Entwicklung des Proepikards durch das ventrikuläre Myokard und den Dottersack entscheidend beeinflusst wird.

5.2.1. Wird die Entwicklung der linken Proepikardanlage durch die früher entstehende rechte Anlage gehemmt?

Die vorliegenden Befunde zeigen nicht nur, dass sich die Proepikardanlagen im Hühnerembryo asymmetrisch, sondern auch asynchron entwickeln. Die rechte proepikardiale Anlage erscheint im HH-Stadium 14, während sich die linke Anlage einige Stunden später im HH-Stadium 15/16 bildet. Dieses asynchrone Auftreten der

Proepikardanlagen könnte darauf beruhen, dass die Bildung der linken Anlage durch Faktoren, die von der rechten Anlage sezerniert werden, gehemmt wird.

In einem dritten Experiment, das von unseren Kooperationspartnern, Herrn R. Abu-Issa, Durham/USA und Herrn J. Schlueter, Würzburg, durchgeführt und daher nicht im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt wurde, wurden *in ovo* mechanisch induzierte *Cardia bifida* in Hühnerembryonen erzeugt. Durch die Spaltung der Darmforte und der daraus resultierenden Bildung zweier Hemi-Herzen wurden die beiden proepikardialen Anlagen räumlich voneinander getrennt. Auch in diesem Experiment blieb die Spezifizierung der molekularen Rechts/Links-Identitäten unbeeinflusst, da der Eingriff erst im HH-Stadium 7/8 erfolgte. Sollte die rechte Anlage einen hemmenden Einfluss auf die später erscheinende linke Anlage haben, wäre zu erwarten gewesen, dass sich beide Anlagen gleichmäßig entwickelten. Die Tatsache, dass sich trotz der Trennung der beiden Proepikardanlagen lediglich die rechte Anlage voll entwickelte und nur das rechte Hemi-Herz mit Epikard bedeckt war, zeigt, dass die Bildung der linken Anlage sehr wahrscheinlich nicht durch die früher entstehende rechte Proepikardanlage gehemmt wird. Weiterhin kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass das Schicksal der beiden Proepikardanlagen bereits vor HH-Stadium 7 festgelegt wird.

Aufgrund der vorliegenden experimentellen Befunde ist es wahrscheinlich, dass die asymmetrische Entwicklung des Proepikards direkt mit den Signalwegen verknüpft ist, die die links- und rechtsseitigen Körperidentitäten bestimmen. Die symmetrische Entwicklung des Proepikards im Mausembryo muss nicht unbedingt gegen diese Hypothese sprechen, da bekannt ist, dass die Rechts/Links-Entwicklung im Mausembryo vielfach anders verläuft als im Hühnerembryo (für Review siehe Schlueter und Brand, 2007). Als Beispiel sei hier die Entwicklung der Ovarien genannt. Während sie im Mausembryo symmetrisch verläuft, d. h. zwei funktionsfähige Ovarien heranreifen, erfolgt sie im Hühnerembryo und in den meisten anderen Vogelspezies asymmetrisch, wobei lediglich das linke Ovar ausreift (König und Liebich, 2001; Mittwoch et al., 1971; Salomon, 1993). Die asymmetrische Bildung wird direkt durch rechts/links-seitenspezifische Signale gesteuert (p450-Aromatase, Bmp7; Hoshino et al., 2005; Villalpando et al., 2000).

5.3. Teil 3: Entwicklung experimenteller Verfahren zur Identifizierung Proepikard induzierender und inhibierender Faktoren

Der Befund, dass sich die proepikardialen Anlagen im Hühnerembryo in einem bilateral asymmetrischen Muster bilden, dürfte für die Identifizierung von Proepikard induzierenden bzw. inhibierenden Faktoren hilfreich sein, da diese ein mit der Proepikardentwicklung korrespondierendes Expressionsmuster zeigen sollten. In Expressionsstudien könnte daher nach bislang unbekanntem Faktoren gesucht werden, die im Zeitraum der Proepikardentwicklung ein asymmetrisches Expressionsmuster im Bereich der beiden Sinushörner aufweisen. Derartige Expressionsstudien werden derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Brand, Würzburg, durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollten experimentelle Methoden entwickelt werden, mit denen bereits identifizierte Kandidaten auf ihre mögliche Proepikard induzierende bzw. inhibierende Wirkung getestet werden sollten. Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben wurde, zeigt sich in den Proepikardanlagen im Hühnerembryo beispielsweise eine deutlich asymmetrische Bmp4-Expression. Bmp4 spielt bereits in frühen Entwicklungsstadien eine wichtige Rolle in der Spezifizierung der Rechts/Links-Achse im Hühnerembryo (Monsoro-Burq und Le Douarin, 2000; 2001) sowie im Zebrafischembryo (Chen et al., 1997; Schilling et al., 1999; Chocron et al., 2007) und im *Xenopus* (Branford et al., 2000; Breckenridge et al., 2001). Aus diesem Grund kann eine Beteiligung von Bmps an der Bildung und eventuell an der Induktion des Proepikards im Hühnerembryo vermutet werden. Der Einfluss von Bmp wurde durch Implantationen von Bmp2-exprimierenden Zellaggregaten bzw. von *Beads*, die mit Bmp2 beladen waren, getestet. Es wurde Bmp2 gewählt, da dies einerseits rekombinant vorhanden war und andererseits Bmp4 so stark in seiner Wirkung ähnelt, dass es Bmp4 *in vitro* ersetzen kann (Brand, 2003). Da kontrollierbare Implantationen ins Gebiet der Proepikardanlagen aus technischen Gründen nur von ventral erfolgen können und der ventrale Zugang *in ovo* nicht möglich ist, wurden die Experimente in *Whole embryo*-Kulturen (siehe 3.2.11.1) durchgeführt, bei denen der Embryo auf seiner dorsalen Seite inkubiert wird.

Eine Implantation von *Beads* oder Zellaggregaten in das Mesenchym der proepikardialen Serosa ist technisch nicht möglich, da die Wand des Sinus venosus hierfür zu dünn ist und zerreißen würde. Als Folge einer Verletzung der Wand des Sinus venosus würde der Embryo umgehend verbluten. Daher wurden die Zellaggregate und

die Beads ins Lumen des rechten oder linken Sinushorns unmittelbar dorsal der proepikardialen Serosa implantiert. Durch den eingesetzten *Bead* oder Zellaggregat wurde das Gefäß abgedichtet, so dass die Gefahr des Verblutens nicht mehr gegeben war und der Defekt der Gefäßwand abheilen konnte (siehe 3.2.11.4.1). Es zeigte sich leider, dass durch diese Art der Implantation mehrere technische Probleme auftraten. Aufgrund des entwicklungsbedingt ansteigenden Blutflusses in den Venenstämmen und der Kontraktionen des Herzschlauchs wurden die *Beads* ausgewaschen oder in distal vom Sinus venosus gelegene Abschnitte des Herzschlauchs verschleppt. Das gleiche Problem trat bei den implantierten Bmp2-exprimierenden Zellaggregaten auf. Dieses experimentelle Verfahren erwies sich daher als ungeeignet.

Um den Auswascheffekt und die strömungsbedingte Verschleppung der Beads auszuschalten, wurden die Implantationen in Organkulturen (siehe 3.2.11.3) wiederholt. Leider führten in dieser Versuchsreihe bereits die Implantationen von Kontrollbeads zum Absterben des darüber liegenden Gewebes. Daher erwies sich auch dieses Verfahren für die Testung von Kandidaten der Proepikardinduktion bzw. -hemmung als ungeeignet.

Aufgrund der oben genannten technischen Probleme, die in erster Linie durch die anatomischen und physiologischen Verhältnisse der Sinusregion verursacht wurden, konnten anhand klassischer Implantationsexperimente keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden.

Als theoretische Alternative zu Implantationsverfahren boten sich Gewebekulturen von Sinusgewebe, das auf einem Agarhügel bzw. einem Stück Schalenmembran aufgesetzt wurde, an. Der theoretische Vorteil derartiger Kulturen gegenüber den oben genannten Verfahren ist, dass auf den Einsatz von Beads verzichtet werden kann. Stattdessen können dem Medium rekombinante Faktoren zugesetzt werden, um anschließend ihre Wirkung auf die Proepikardentwicklung beurteilen zu können. Es zeigte sich jedoch bereits in den Kontrollversuchen, dass sich kein proepikardialer Phänotyp ausbildete (Daten nicht gezeigt). Dieses Verfahren der Gewebekultur war daher ebenfalls nicht geeignet, um mögliche Proepikard induzierende oder hemmende Faktoren zu identifizieren.

Als Alternative zu den beiden oben genannten topischen Applikationsverfahren bieten sich Elektroporationsverfahren an, bei denen DNA direkt in die Zellen der proepikardialen Serosa eingebracht wird. Bei dieser Methode sind allerdings technische Probleme in der Durchführung zu erwarten, da das zu elektroporierende Gewebe des Sinus venosus sehr dünn ist und somit eine ortsgenaue Applikation erschwert wird.

5.4. Teil 4: Differenzierung der proepikardialen Vorläuferzellpopulation

5.4.1. Liefert das Proepikard Vorläuferzellen für das koronare Lymphgefäßsystem?

Wie bereits mehrfach erwähnt wurde, haben Studien der letzten 10 Jahre gezeigt, dass sämtliche Zellen des koronaren Blutgefäßsystems von den Vorläuferzellen des Proepikards abstammen (siehe 2.5.4.3). Im reifen Wirbeltierherzen werden die Blutgefäße von Lymphgefäßen begleitet. Über die Entwicklung des koronaren Lymphgefäßsystems sind bislang nur unzureichende Daten vorhanden, weil bisher lymphgefäßspezifische Marker fehlten. Aufgrund dieser Tatsache behalf man sich mit Injektionsexperimenten, mit denen die Ausbreitung der Lymphgefäßentwicklung von der Herzbasis in Richtung der Herzspitze dokumentiert wurde (Rychter et al., 1971; Klika et al., 1972). Injektionsexperimente lassen jedoch keine Aussagen über eventuell vaskulogenetisch (*in situ*) gebildete Lymphgefäße zu, da nur bereits miteinander verbundene Gefäße dargestellt werden können. Die Herkunft der kardialen Lymphgefäße wurde ebenfalls aufgrund fehlender molekularer Marker bislang nicht untersucht. Durch den mittlerweile gut etablierten Lymphendothelmarker Prox1 konnten in dieser Arbeit die bisherigen Erkenntnisse über die räumliche und zeitliche Ausbreitung des koronaren Lymphgefäßsystems durch *Whole mount*-Immunfärbungen mit polyklonalen Prox1-Antikörpern bestätigt werden.

Aufgrund der großen Nähe zu den koronaren Blutgefäßen lag die Vermutung nahe, dass die koronaren Blut- und Lymphgefäße denselben Ursprung haben könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit Wachtel/Huhn-Chimären (siehe 3.2.11.5) nach einem etablierten Verfahren konstruiert, bei denen ein Wachtelproepikard homotop *in ovo* in einen altersentsprechenden Hühnerembryo transplantiert wurde (Männer, 1999). Nach sechs weiteren Bebrütungstagen wurden

Doppelfärbungen mit dem Wachtelendothel spezifischen Antikörper QH1 und dem Lymphendothel spezifischen Antikörper Prox1 durchgeführt. Sollte das Proepikard auch das Endothel des kardialen Lymphgefäßsystems liefern, wäre zu erwarten gewesen, dass Gefäße nachgewiesen werden, deren Endothelien sowohl mit Prox1 als auch mit QH1 markiert sind.

Das Endothel der koronaren Blutgefäße war QH1-positiv und Prox1-negativ. Dadurch wurde zum einen bestätigt, dass das Proepikard das Endothel des koronaren Blutgefäßsystems liefert. Zum anderen konnte dadurch gezeigt werden, dass das Chimärisierungsexperiment erfolgreich verlaufen war. Es konnten allerdings in keinem der Chimärisierungsexperimente QH1-positive Endothelzellen in den kardialen Lymphgefäßen des Wirtsembryos nachgewiesen werden. Anhand dieser Befunde kann ausgeschlossen werden, dass proepikardiale Vorläuferzellen sich *in ovo* zu Lymphendothelzellen differenzieren.

Es gab jedoch eine Ausnahme auf Höhe der Herzbasis, wo sich ein großes lymphatisches Sammelgefäß befand, das eine kleine Anzahl an QH1-positiven Zellen aufwies. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um eine Lymph-/Venen-Anastomose handelte, die sich womöglich durch Einwachsen venöser Endothelzellen in ein bestehendes lymphatisches Gefäß bildet. Derartige Anastomosen wurden in adulten Schweineherzen und in menschlichen Herzen nachgewiesen (Vajda et al., 1972).

Zusammenfassend ergaben die vorliegenden Chimärisierungsexperimente, dass das Proepikard des Vogelembryos zwar das Endothel des kardialen Blutgefäßsystems liefert, jedoch nicht das Endothel der kardialen Lymphgefäße, obwohl sich beide Gefäßsysteme in großer räumlicher Nähe zueinander entwickeln. Die Herkunft der kardialen Lymphgefäße bleibt daher ungeklärt. Aufgrund der Ausbreitung der Lymphgefäße, die anhand von *Whole mount*-Immunfärbungen dargestellt werden konnte, kann jedoch vermutet werden, dass die kardialen Lymphgefäße von den Lymphsäcken im Bereich der Jugularvenen stammen, von wo sie sich über die großen Gefäße in kaudaler Richtung zum embryonalen Herzen ausbreiten.

6. LITERATUR

Alsan, B. H. und T. M. Schultheiss (2002). Regulation of avian cardiogenesis by Fgf-8 signaling. *Development* 129(8):1935-1943.

Andree, B., Duprez, D., Vorbusch, B., Arnold, H. H., Brand, T. (1998). Bmp2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev* 70(1-2):119-131.

Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., Jackson, D. G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144(4):789-801.

Barron, M., Gao, M., Lough, J. (2000). Requirement for Bmp and Fgf signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient and cooperative. *Dev Dyn* 218:383-393.

Bouchev, D., Drake, C.J., Wunsch, A.M., Little, C.D. (1996). Distribution of connective tissue proteins during development and neovascularization of the epicardium. *Cardiovasc Res* 31:104-115.

Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258(1):1-19.

Branford, W. W., Essner, J. J., Yost, H. J. (2000). Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between xenopus lefty and BMP4 signaling. *Dev Biol* 223(2):291-306.

Breckenridge, R. A., Mohun, T. J., Amaya, E. (2001). A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol* 232(1):191-203.

- Breiteneder-Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H., Horvat, R., Amann, G., Kriehuber, E., Diem, K., Weninger, W., Tschachler, E., Alitalo, K., Kerjaschki, D. (1999).** Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 154:385-394.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A., Kispert, A. (2004).** The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev* 18(10):1209-1221.
- Buttler, K., Kreysing, A., von Kaisenberg, C. S., Schweigerer, L., Gale, N., Papoutsis, M., Wilting, J. (2006).** Mesenchymal cells with leukocyte and lymphendothelial characteristics in murine embryos. *Dev Dyn* 235(6):1554-1562.
- Chapman, S. C., Collignon J., Schoenwolf, G. C., Lumsden, A. (2001).** Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn* 220(3):284-289.
- Chen, J., van Eeden, F. J., Warren, K. S., Chin, A., Nüsslein-Volhard, C., Haffter, P., Fishman, M. C. (1997).** Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* 124(21):4373-4382.
- Chocron, S., Verhoeven, M. C., Rentzsch, F., Hammerschmidt, M., Bakkers, J. (2007).** Zebrafish Bmp4 regulates left-right asymmetry at two distinct developmental time points. *Dev Biol* 305(2):577-588.
- Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T., Trow, M., O., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. F., Kispert, A. (2006).** Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res* 98(12):1555-1563.
- Chuang, H. H. und Tseng, M. P. (1957).** An experimental analysis of the determination and differentiation of the mesodermal structures of neurula in urodeles. *Sci Sin* 6(4):669-708.

Cryer, D. R., Eccleshall R., Marmur, J. (1975). Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol* 12:39-44.

Davis, C. L. (1924). The cardiac jelly of the chick embryo. *Anat Rec* 27:201-202.

Dettman, R. W., Denetclaw, W., Jr., Ordahl, C. P., Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 193(2):169-181.

Duprez, D. M., Kostakopoulou, K., Francis-West, P. H., Tickle, C., Brickell, P. M. (1996). Activation of Fgf-4 and HoxD gene expression by Bmp2 expressing cells in the developing chick limb. *Development* 122(6):1821-1828.

Dyson, E., Sukov, H.M., Kubalak, S. W., Schmid-Schonbein, G. W., DeLano, F. A., Evans, R. M., Ross, J. Jr., Chien, K. R. (1995). Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha $-/-$ mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7386-7390.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hailan, K. J., Moore, M. W. (1996). Heterozygous lethality induced by targeted inactivation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol* 23:5680-5691.

Fransen, M. E. und Lemanski, L. F. (1990). Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Anat Rec* 226:228-236.

Garcia-Martinez, V. and Schoenwolf, G. C. (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* 159(2):706-719.

Gittenberger-de Groot, A. C., Vrancken Peeters, M. P., Mentink, M. M., Gourdie, R. G., Poelmann, R. E. (1998). Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* 82(10):1043-1052.

Goldstein, A. M., Fishman, M. C. (1998). Notochord regulates cardiac lineage in zebrafish embryos. *Dev Biol* 201:247-252.

Haenig, B. und Kispert, A. (2004). Analysis of *Tbx18* expression in chick embryos. *Dev Genes Evol* 214(8):407-411.

Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:577-580.

Herzer, U., Crocoll, A., Barton, D., Howells, N., Englert, C. (1999). The Wilms tumor suppressor gene *Wt1* is required for development of the spleen. *Curr Biol* 9(15):837-840.

Hirakow, R. (1992). Epicardial formation in staged human embryos. *Acta Anat Nippon* 67:616–622.

Hiruma, T. und Hirakow, R. (1989). Epicardial formation in embryonic chick heart: Computer-aided reconstruction, scanning and transmission electron microscopic studies. *Am J Anat* 184:129-138.

Ho, E. und Shimada, Y. (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 66:579–585.

Hoshino, A., Koide, M., Ono, T., Yasugi, S. (2005). Sex-specific and left-right asymmetric expression pattern of *Bmp7* in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos. *Dev Growth Differ* 47: 65–74.

Hurlé, J. M., Kitten, G. T., Sakai, L. Y., Volpiun, D., Solursh, M. (1994). Elastic extracellular matrix of the embryonic chick heart: An immunohistological study using laser confocal microscopy. *Dev Dyn* 200:321–332.

- Hutson, M. R., Kirby, M. L. (2003).** Neural crest and cardiovascular development: a 20-year perspective. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:2-13.
- Icardo, J. M., Fernández-Terán, M. A., Ojeda, J. L. (1990).** Late heart embryology. The making of an organ; in Meisami, E., P.S. Timiras (eds): *Handbook of Human Growth and Developmental Biology*. Boca Raton, CRC Press, pp 25–49.
- Jacobson, A. G. (1960).** Influences of ectoderm and endoderm on heart differentiation in the Newt. *Dev Biol* 2:138-154.
- Jacobson, A. G. (1961).** Heart determination in the Newt. *J Exp Zool* 146:139-151.
- Kálmán, F., Virágh, S., Modis, L. (1995).** Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. *Anat Embryol* 191:451-464.
- Kampmeier, O. F. (1912).** The value of the injection method in the study of lymphatic development. *Anat Rec* 6:223-233.
- Kim, H., Yoon, C. S., Kim, H., Rah, B. (1999).** Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell Struct Funct* 24:19-26.
- Kirby, M. L. (2007).** *Cardiac development*. Oxford University Press, New York.
- Kirschner, K. M., Wagner, N., Wagner, K. D., Wellmann, S., Scholz, H. (2006).** The Wilms tumor suppressor *Wt1* promotes cell adhesion through transcriptional activation of the $\alpha 4$ integrin gene. *J Biol Chem* 281(42):31930-31939.
- Klika, E., Antalíková, L., Rychter, Z., Jelínek, R. (1972).** Inception and manner of development of the lymph vessels in the chick embryo heart. *Lymphology* 5:137-148.
- König, H. E., Liebich, H.-G. (2001).** *Anatomie und Propädeutik des Geflügels*. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Komiyama M., Ito K., Shimada Y. (1987). Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol* 176:183-189.

Kraus, F., Haenig, B. und Kispert, A. (2001). Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev* 100:83-86.

Kreidberg, J., Sariola, H., Loring, J., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Jaenisch, R. (1993). Wt1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691.

Kruithof, B. P., van Wijk, B., Somi, S., Kruithof-de Julio, M., Pérez Pomares, J. M., Weesie, F., Wessels, A., Moorman, A. F., van den Hoff, M. J. (2006). Bmp and Fgf regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* 295(2):507-522.

Kuhn H. J., Liebherr G. (1988). The early development of the epicardium in *Tupaia belangerie*. *Anat Embryol* 177:225-234.

Kurkiewicz T. (1909). O histogenezie miesna sercowego zwierzat kregowych – Zur Histogenese des Herzmuskels der Wirbeltiere. *Bull Int Acad Sci Cracovie*:148-191.

Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H.M., Stewart, C. L., Buck, C., Buck, C. A., Labow, M. A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* 121:489-503.

Levin, M. Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82:803-814.

Logan, M. Pagan-Westphal, S. M., Smith, D. M., Paganessi, L., Tabin, C. J. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94:307-317.

Lough, J., Barron, M., Brogley, M., Sugi, Y., Bolender, D. L., Zhu, X. (1996).

Combined Bmp2 and Fgf-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Dev Biol* 178:198-202.

Lough, J. und Sugi, Y. (2000). Endoderm and heart development. *Dev Dyn*

217(4):327-342.

Majesky, M. W. (2004). Development of coronary vessels. *Curr Top Dev Biol* 62:225-

259.

Mangold, O. (1954). Entwicklung und Differenzierung der präsumptiven Epidermis

und ihres unterlagerten Entomesoderms aus der Neurula von *Triton alpestris* als Isolat.

Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. 147:131-170.

Männer, J. (1992). The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat*

Embryol (Berl) 186:379-385.

Männer, J. (1993). Experimental study on the formation of the epicardium in chick

embryos. *Anat Embryol (Berl)* 187(3):281-289.

Männer, J. (1999). Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to

the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate

of the epicardial primordium. *Anat Rec* 255(2):212-226.

Männer, J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with

special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process.

Anat Rec 259:248-262.

Männer, J., Pérez-Pomares, J. M., Macias, D., Muñoz-Chapuli, R. (2001). The

origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells*

Tissues Organs 169:89-103.

- Männer, J. (2004).** On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: new insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 1:481-492.
- Männer, J. (2006).** Extracardiac tissues and the epigenetic control of myocardial development in vertebrate embryos. *Ann. Anat.* 188:199-212.
- Markwald, R. R., Eisenberg, C., Eisenberg, L., Trusk T., Sugi, Y. (1996).** Epithelial-mesenchymal transformations in early avian heart development. *Acta Anat* 156:173-186.
- Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., Solnica-Krezel L. (2002).** *Curr Biol* 12(11):876-884.
- Mikawa, T. und Fischman, D. A. (1992).** Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20):9504-9508.
- Mikawa, T. und Gourdie, R. G. (1996).** Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 174(2):221-32.
- Mittwoch, U., Narayanan, T. L., Delhanty, J. D., Smith, C. A. (1971).** Gonadal growth in chick embryos. *Nat New Biol* 16;231(24):197-200.
- Mollier, S. (1906).** Die erste Anlage des Herzens bei den Wirbeltieren. In: Hertwig, O., editor. *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere (The first anlage of the heart in vertebrates)*, vol. 1. Jena: Gustav Fischer. p. 1026-1051.
- Monsoro-Burq, A., Le Douarin, N. M. (2000).** Left-right asymmetry in BMP4 signalling pathway during chick Gastrulation. *Mech Dev* 97(1-2):105-108.

Monsoro-Burq, A., Le Douarin, N. M. (2001). Bmp4 plays a key role in left-right patterning in chick embryos by maintaining Sonic Hedgehog asymmetry. *Mol Cell* 7(4):789-799.

Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N.D., Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126:1845–1857.

Morabito, C., Dettman, R., Kattan, J., Collier, J., Bristow, J. (2001). Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol* 234:204-215.

Muñoz-Chápuli, R., Macías, D., Ramos, C., De Andrés, A.V., Gallego, A., Navarro, P. (1994). Heart development in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*): A model for the study of the basic processes of vertebrate cardiogenesis. *Cardioscience* 5:245–253.

Muñoz-Chápuli, R., Macías, D., Ramos, C., Gallego, A., De Andrés, V. (1996). Development of the subepicardial mesenchyme and the early cardiac vessels in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *J Exp Zool* 275:95–111.

Muñoz-Chapuli, R., Gallego, A., Pérez-Pomares, J. M. (1997). A reaction-diffusion model can account for the anatomical pattern of the cardiac conal calves in fish. *J Theor Biol* 185(2):233-240.

Nahirney, P. C., Mikawa, T., Fischman, D. A. (2003). Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. *Dev Dyn* 227(4):511-23.

Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E. P., Doe, C. Q., Gruss, P. (1993). Prox 1, a *prospero*-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev* 44:3-16.

Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L. M., Kühl, M. (2002). Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418(6898):636-641.

Papoutsi, M., Tomarev, S. I., Eichmann, A., Prols, F., Christ, B., Wilting, J. (2001). Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Dev Dyn* 222(2):238-251.

Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lièvre, F. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100:339-349.

Pérez-Pomares, J. M., Macías D., García-Garrido, L., Muñoz-Chápuli, R. (1997). Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn* 210:96–105.

Pérez-Pomares, J. M., Macías D., García-Garrido, L., Muñoz-Chápuli, R. (1998a). The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: An immunohistochemical and quailchick chimera study. *Dev Biol* 200:57–68.

Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M., Bokenkamp, R. Hogers, B. (1993). Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 73(3):559-68.

Raya, A., Belmonte, J. C. (2004). Sequential transfer of left-right information during vertebrate embryo development. *Curr Opin Genet Dev.* 14(5):575-81.

Rodriguez-Niedenführ M., Papoutsi, M., Christ, B., Nicolaides, K. H., von Kaisenberg, C. S., Tomarev, S. I., Wilting, J. (2001). *Prox1* is a marker of ectodermal placodes, endodermal compartments, lymphatic endothelium and lymphangioblasts. *Anat Embryol* 204:399-406.

Rosenquist, G. C. (1970). Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: the heart-forming portion of the primitive streak. *Dev Biol* 3:461-475.

Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D. P., Robertson, E. J., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G., Izpisua Belmonte, J. C. (1998).

Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394:545-551.

Rychter, Z., Jelínek, R., Klika, E., Antalíková, L. (1971). Development of the lymph bed in the wall of the chick embryo heart. *Physiol bohemoslov* 20:533-539.

Sabin, F. R. (1902). On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1:367-389.

Salomon, F.-V. (1993). Lehrbuch der Geflügelanatomie. Gustav Fischer-Verlag, Jena.

Schilling, T. F., Concordet, J. P., Ingham, P. W. (1999). Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev Biol* 210(2):277-287.

Schlueter, J., Männer, J., Brand, T. (2006). BMP is a important regulator of proepicardial idnetity in the chick embryo. *Dev Biol* 295(2):546-558.

Schlueter, J. und Brand, T. (2007). Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. *Cytogen Gen Res* 117(1-4):256-67.

Schneider, A., Mijalski, T., Schlange, T., Dai, W., Overbeek, P., Arnold, H. H., Brand, T. (1999). The homeobox gene NKX3.2 is a target of left-right signalling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr Biol* 9(16):911-4.

Scholz, H., Kirschner, K. M. (2005). A role for the Wilms' tumor protein Wt1 in organ development. *Physiology (Bethesda)* 20:54-59.

Schultheiss, T. M., Burch J. B., Lassar, A. B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 11(4):451-62.

Shimada, Y., Ho, E. (1980). Scanning electron microscopy of the embryonic chick heart: Formation of the epicardium and surface structure of the four heterotypic cells that contribute to the embryonic heart; in Van Praagh, R., A. Takao (eds): Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease. New York, Futura, pp 63–80.

Solloway, M. J., Harvey, R. P. (2003). Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res* 58(2):264-277.

Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., K. Chien, R. M. Evans (1994). RXR α mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 8:1007–1018.

Tidball, J. G. (1992). Distribution of collagens and fibronectin in the subepicardium during avian cardiac development. *Anat Embryol* 185:155–162.

Tomanek, R. J., Huang, L., Suvarna, P. R., O'Brien, L. C., Ratajska, A., Sandra, A. (1996). Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res* 31: E116–E126.

Tomarev, S. I., Sundin, O., Banerjee-Basu, S., Duncan, M. K., Yang, J., Piatigorsky, J. (1996). Chicken homeobox gene Prox 1 related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina. *Dev Dyn* 206:354-367.

Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., Chang, B., Haves, N. L. (1998). Characterization of the mouse PROX1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 248:648-689.

Vajda, J., Tomcsik, M., van Doorenmaalen, W. J. (1972). Connections between the venous system of the heart and the epicardiac lymphatic network. *Acta Anat (Basel)* 83:262-274.

Villalpando, I., Sanchez-Bringas, G., Sanchez-Vargas, I., Pedermera, E., Villafan-Monroy, H. (2000). The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 117: 325–334.

Virágh S., Challice C. E. (1981). The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 201:157-168.

Virágh, S., Kálmán, F., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., Moorman, A. F. M. (1990). Angiogenesis and hematopoiesis in the epicardium of the vertebrate embryo heart; in Bockman, D.E., M.L. Kirby (eds): *Embryonic Origins of Defective Heart Development*. *Ann NY Acad Sci* 588:455–458.

Virágh, S., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., Kálmán F. (1993). Early development of the quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol* 188:381-393.

Vrancken-Peeters, M.-P. F. M., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M. T., Poelmann, R. E. (1999). Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol* 199:367–378.

Wigle, J. T. und Oliver, G. (1999). PROX1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98(6):769-78.

Wigle, J. T., Harvey, N., Detmar, M., Lagutina, I., Grosveld, G., Gunn, M. D., Jackson, D. G., Oliver, G. (2002). An essential role for PROX1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *Embo J* 21(7):1505-1513.

Wilting, J., Papoutsi, M., Schneider, M., Christ, B. (2000). The lymphatic endothelium of the avian wing is of somitic origin. *Dev Dyn* 217(3):271-8.

Wilting, J., Papoutsi, M., Christ, B., Nicolaidis, K. H., von Kaisenberg, C. S., Borges, J., Stark, G. B., Alitalo, K., Tomarev, S. I., Niemeyer, C., Rössler, J. (2002). The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased tissues. *FASEB J.* 16:1271-1273.

Wilting, J., Aref, Y., Huang, R., Tomarev, S. I., Schweigerer, L., Christ, B., Valasek, P., Papoutsi, M. (2006). Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol* 292:165-173.

Winter, E. M., Gittenberger-de Groot, A. C.. (2007). Cardiovascular development: towards biomedical applicability : Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 6:692-703.

Yang, J. T., Rayburn, H., Hynes, R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by $\alpha 4$ integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121:549–560.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungen und Nomenklaturregeln

BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.)
ED	<i>embryonic day</i> (Stadierung der embryonalen Mausentwicklung)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FAST DiI	1,1'-dilinoylel-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat
Gln	Glutamin
H ₂ O _{bidest}	Wasser, zweifach destilliert
HH	Stadierung von Hühner- und Wachtelebryonen nach Hamburger, V. und Hamilton, H. L. (1951)
HRP	<i>horse radish</i> -Peroxidase
kb	Kilobasenpaare
MeOH	Methanol
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
NTP	Nukleotidtriphosphat
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Pyr	Pyruvat
RNA	Ribonukleinsäure (engl.)
Upm	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
Vol.	Volumen

7.2. Publikationen

Schulte, I., Schlueter, J., Radwan, A. I., Brand, T., Männer, J. (2007). Morphological and molecular left-right asymmetries in development of the proepicardium: a comparative analysis on mouse and chick embryos. *Dev Dyn* 236:684–695

Wilting, J., Buttler, K., Schulte, I., Papoutsi, M., Schweigerer, L., Männer, J. (2007). The proepicardium of avian embryo delivers hemangioblasts but not lymphangioblasts to the developing heart. *Dev Biol* 305(2):451-459.

8. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt ganz besonders meinen Eltern, die mir bereits im Verlauf meines Biologiestudiums jederzeit bei kleineren und größeren Problemen hilfreich zur Seite standen. Ohne eine so großartige Unterstützung hätte ich vermutlich nicht den Schritt zu der anschließenden Doktorarbeit gewagt. Meinem Bruder Iver danke ich für seine große Geduld, mit der er mir schon während meines Studiums bei mathematischen und physikalisch-chemischen Fragestellungen immer rettend zur Seite stand. Ich danke auch meinem Freund Paul, der mich trotz seiner eigenen anstrengenden und fordernden Referendatszeit stets unterstützte.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Jörg Männer für die Überlassung des herausfordernden Dissertationsthemas bedanken. Auf seine konsequente Unterstützung in der Durchführung der Experimente und seine höchst kompetente Hilfe beim Verfassen der Dissertation konnte ich mich immer verlassen.

Herrn Hannes Sydow möchte ich mich für die freundschaftliche und immer sehr unterhaltsame Arbeitsatmosphäre bedanken. Dazu haben auch regelmäßig alle lieben Labormitstreiter beigetragen, namentlich möchte ich hier besonders Juliane Plitzner, Kirsten Falk-Stietenroth und Heike Faust hervorheben und ihnen für die schöne Zeit und nette Unterstützung danken.

9. LEBENSLAUF

Ich wurde am 27. September 1976 in Hildesheim geboren und bin ledig.

Nach meinem Abitur am Gymnasium Uetze begann ich am 01. August 1996 einen Ausbildungsabschnitt zur Kauffrau im Einzelhandel innerhalb der Fortbildung zur Geprüften Handelsassistentin – Einzelhandel, den ich am 15. Januar 1998 mit der Prüfung zur Kauffrau im Einzelhandel abschloss.

Nachdem ich innerhalb der Fortbildung zur Geprüften Handelsassistentin am 17. April 1998 die Ausbilderprüfung bestanden hatte, verließ ich auf eigenen Wunsch zum 30. September 1998 das Ausbildungs-Unternehmen *Jeans Fritz GmbH*.

Im Wintersemester 1998/1999 begann ich mit dem Diplomstudiengang im Fach Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen.

Die Diplomvorprüfung bestand ich am 18. Oktober 2000 mit der Note „Sehr gut“. In der Diplomprüfung mit den Schwerpunkten Mikrobiologie (Hauptfach), Genetik und Pharmakologie erhielt ich am 28. November 2003 die Note „Gut“. Meine Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchung eines putativen Invertasegens von *Corynebacterium glutamicum* und des davon kodierten Enzyms“ fertigte ich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Liebl im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen an.

Im März 2004 schloss sich das dreijährige, von der DFG geförderte Projekt mit dem Titel „Induktion und Differenzierung der proepikardialen Serosa: Analyse einer Vorläuferzellpopulation des embryonalen Herzens“ im Institut für Anatomie in der Abteilung Anatomie und Embryologie der Georg-August-Universität Göttingen unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. med. J. Männer an.