

Aus der Abteilung Anatomie und Embryologie
(Prof. Dr. med. C. Viebahn)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Lageentwicklung des Proepikards und des Mündungsabschnittes
des Pulmonalvenenstammes bei *Xenopus laevis***

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Maike Jahr

aus

Püttlingen

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. J. Männer

II. Berichterstatter/in: PD Dr. med. R. G. Seipelt

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2010

1.0 Einleitung	1
1.1 Rechts/Links-Asymmetrien der inneren Organe	2
1.2 Molekulare Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse	5
1.3 Das Proepikard	7
1.3.1 Transfer der Proepikardzellen zum Herzen	7
1.3.2 Derivate des Proepikards	8
1.3.3 Lageentwicklung des Proepikards	8
1.4 Der Pulmonalvenenstamm	9
1.4.1 Lageentwicklung des MPV	10
1.5 Erfolgt die Entwicklung des PE und des MPV in Abhängigkeit von der Spezifizierung der Rechts/Links-Achse?	11
1.6 Ziele der Arbeit	12
2.0 Material und Methoden	13
2.1 Embryonen.....	13
2.2 Histologie	14
2.3 Rasterelektronenmikroskopie	14
2.4 „Cell Lineage Tracing“ und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	16
3.0 Befunde	18
3.1 Lageentwicklung des Proepikards	18
3.2 Lageentwicklung des Mündungsabschnittes des Pulmonal- venenstammes	24
4.0 Diskussion	31
4.1 Lageentwicklung des PE	31
4.1.1 Ausblick	33
4.2 Lageentwicklung des MPV	34

4.2.1 Lagebeziehung des MPV zum Sinus venosus und zum primitiven Vorhof	35
4.2.2 Lagebeziehung des MPV zur Rechts/Links-Körperachse	36
4.2.3 Unpaarigkeit versus Paarigkeit der MPV-Anlage	37
4.2.4 Ausblick	38
5.0 Zusammenfassung	39
6.0 Literaturverzeichnis	42

1.0 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei bisher noch nicht näher untersuchten Aspekten der Herzentwicklung beim Xenopusembryo. Dies sind die Lageentwicklung des Proepikards und die Lageentwicklung der Mündung des Pulmonalvenenstammes. Das Proepikard (PE) ist eine embryonale Zellpopulation, die die Vorläuferzellen für das Epikard, das kardiale Interstitium und die Koronargefäße liefert (Männer et al. 2001). Der Pulmonalvenenstamm ist ein venöses Gefäß, das das Blut aus den rechten und linken Lungenvenen aufnimmt und normalerweise zum linken Vorhof führt.

Untersuchungen an Hühner- und Reptilienembryonen haben gezeigt, dass sowohl für das PE als auch für den Mündungsabschnitt des Pulmonalvenenstammes (MPV) primär bilateral paarige Anlagen gebildet werden, deren weitere Entwicklung bilateral asymmetrisch erfolgt (Fedorow 1910; Dor et al. 1987; Kutsche und Van Mierop 1988; Männer et al. 2001; Männer und Merkel 2007; Schulte et al. 2007). So bildet sich ein funktionstüchtiges PE bei Hühnern und wahrscheinlich auch bei Reptilien lediglich aus der rechten PE-Anlage (Männer et al. 2001; Schulte et al. 2007) und der MPV entsteht bei Hühnern und Reptilien lediglich aus einer linksseitigen Anlage (Fedorow 1910; Dor et al. 1987; Kutsche und Van Mierop 1988; Männer und Merkel 2007). Es wird vermutet, dass die bilateral asymmetrische Entwicklung dieser beiden Gebilde in direkter Abhängigkeit von der Festlegung der Rechts/Links-Körperachse erfolgt, doch konnte dies bislang noch nicht experimentell untermauert werden (Schulte et al. 2007; Männer und Merkel 2007).

In den folgenden Abschnitten sollen zunächst grundlegende Kenntnisse für das Verständnis der vorliegenden Arbeit vermittelt werden. Hierbei werde ich mit einer kurzen Darstellung der funktionellen Bedeutung einiger viszeraler Rechts/Links-Asymmetrien und deren entwicklungsbiologischen Grundlagen beginnen. Anschließend werde ich die für meine Arbeit relevanten Aspekte der Entwicklung des PE und des MPV darstellen.

1.1 Rechts/Links-Asymmetrien der inneren Organe

Die inneren Organe von Wirbeltieren zeigen artspezifische Rechts/Links-Asymmetrien in ihrer Lage und Form, die auch als viszeraler *Situs solitus* bezeichnet werden. Angeborene Abweichungen vom *Situs solitus* können von mehr oder weniger großer funktioneller Bedeutung sein. Die wohl bekannteste Abweichung ist der *Situs inversus*. Beim *Situs inversus* sind sämtliche inneren Organe spiegelbildlich zur normalen Form und Lage ausgebildet. Ein *Situs inversus* hat in der überwiegenden Zahl der Fälle keine negativen funktionellen Auswirkungen für die Betroffenen und wird daher meist zufällig diagnostiziert. Anders verhält es sich bei der so genannten *Heterotaxie*, die auch als *Situs ambiguus* bezeichnet wird. Hier liegen nur einzelne Organe spiegelbildlich zum Normalen vor, die übrigen Organe zeigen reguläre Verhältnisse (Bartram et al. 2005; Jacobs et al. 2007). Ein Sonderfall der *Heterotaxie* ist der *Isomerismus*. Beim *Isomerismus* liegen normalerweise asymmetrisch ausgebildete paarige Organe in einem rechts- oder linkssymmetrischen Muster vor (Bartram et al. 2005; Jacobs et al. 2007). Betrachtet man zum Beispiel die Lungen. Diese unterscheiden sich normalerweise durch die Anzahl ihrer Lappen und das Verzweigungsmuster der sie versorgenden Bronchien und Arterien (Abb. 1). Beim Menschen finden sich auf der rechten Seite normalerweise drei und auf der linken Seite zwei Lungenlappen. Der rechte Hauptbronchus ist im Vergleich zum Linken kürzer und zeigt einen steileren Verlauf, der in etwa den Verlauf der Trachea fortsetzt. Der linke Hauptbronchus ist länger als der rechte und stärker als dieser zur Seite abgewinkelt. Weiterhin verläuft der rechte Hauptbronchus kranial von der rechten Pulmonalarterie und wird daher auch als *eparterieller Bronchus* bezeichnet, während der linke Hauptbronchus kaudal von der linken Pulmonalarterie verläuft und daher auch als *hyparterieller Bronchus* bezeichnet wird.

Im Falle eines vollständig ausgeprägten rechtsseitigen *Isomerismus* finden sich zwei morphologisch rechte, d.h. dreilappige, Lungen und zwei kurze, steil verlaufende *eparterielle* Hauptbronchien (Abb. 1 C). Im Falle eines vollständig ausgeprägten linksseitigen *Isomerismus* finden sich zwei morphologisch linke, d.h. zweilappige, Lungen und zwei lange *hyparterielle* Hauptbronchien (Abb. 1 D).

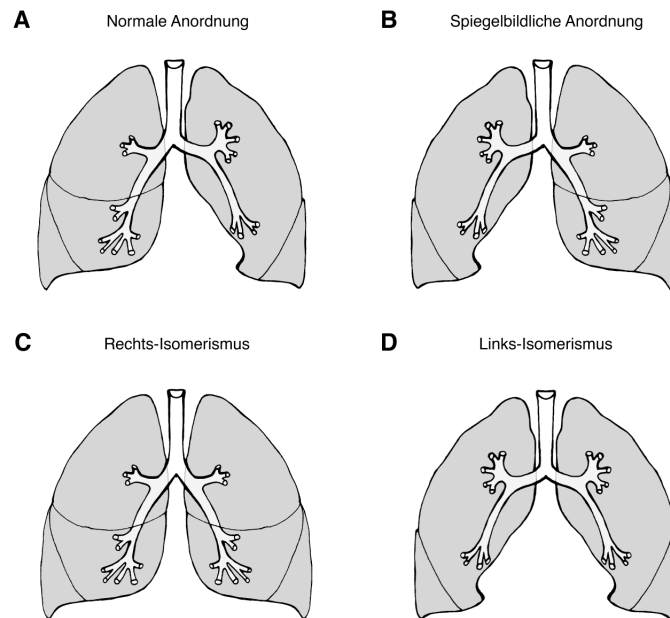


Abb. 1: Schematische Darstellung der möglichen Anordnungen des Lungensitus; **A** normaler Lungensitus (Situs solitus). Die rechte Lunge zeigt drei Lappen, der rechte Hauptbronchus ist kurz und zeigt einen steilen Verlauf. Die linke Lunge besitzt zwei Lappen und der linke Hauptbronchus ist länger als der Rechte und stärker abgewinkelt. **B** Situs inversus; **C** rechtsseitige Isomerie der Lungen und **D** linksseitige Isomerie der Lungen.

Für die Lungenfunktion spielt es keine große Rolle, ob ein Organismus bilateral asymmetrisch (Situs solitus/inversus) oder bilateral symmetrisch (rechts- bzw. linksseitiger Isomerismus) ausgebildete Lungen besitzt. Anders sieht die Situation jedoch aus, wenn wir das reife menschliche Herz betrachten. Hier zeigen sich Rechts/Links-Asymmetrien auf der Vorhofsebene und sind von großer funktioneller Bedeutung, da sie z.B. für die Trennung des großen und kleinen Kreislaufes auf der venösen Seite sorgen (Abb. 2). Die beiden Vorhöfe unterscheiden sich in drei wesentlichen Merkmalen voneinander: **(1.) Der Form und Größe der Herzohren:** So besitzt der rechte Vorhof ein schnauzenförmiges und im Vergleich zum linken Vorhof deutlich größeres Herzohr. Das linke Herzohr ist nicht nur kleiner als das Rechte, sondern zeigt auch eine andere Form, die häufig als geweihförmig beschrieben wird. **(2.) Dem Besitz eines subepikardial gelegenen Sinusknotens,** der sich normalerweise nur im rechten Vorhof im Bereich der Mündung der oberen Hohlvene findet. **(3.) Den Verbindungen zu den Venen des Körper- und Lungenkreislaufes:** So nimmt der rechte Vorhof normalerweise die Körpervenen auf, wohingegen der linke Vorhof die Pulmonalvenen aufnimmt.

Im Falle eines vollständig ausgeprägten rechtsseitigen Isomerismus wäre zu erwarten, dass beide Vorhöfe ein morphologisch rechtes Herzohr und jeweils einen Sinusknoten besitzen. Lungenvenenmündungen sollten in keinem der beiden Vorhöfe vorhanden sein, wohingegen die Körpervenien sowohl an den rechts- als auch an den links gelegenen Vorhof angeschlossen sein dürften. Bei einem vollständig ausgeprägten linksseitigen Isomerismus wäre demzufolge zu erwarten, dass beide Vorhöfe ein morphologisch linkes Herzohr besitzen, während ein Sinusknoten in keinem der beiden Vorhöfe zu finden sein dürfte. Die rechten Lungenvenen sollten in den rechts gelegenen Vorhof münden und die linken Lungenvenen in den links gelegenen Vorhof. Man kann sich leicht vorstellen welche funktionellen Beeinträchtigungen sich sowohl aus einem rechts- als auch aus einem linksseitigen Isomerismus der Herzvorhöfe ergeben würden.

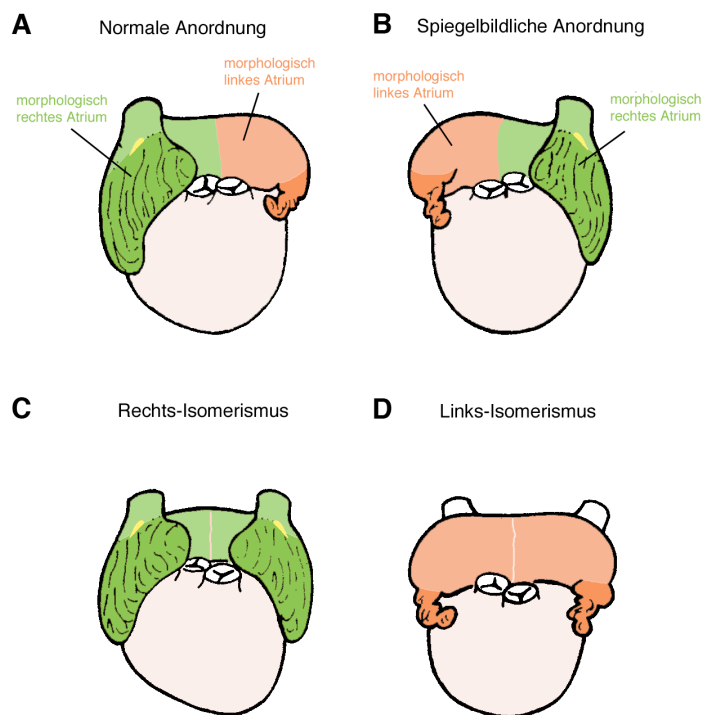


Abb. 2: Schematische Darstellung der möglichen Anordnungen des atrialen Situs; **A** normaler atrialer Situs (Situs solitus). Das morphologisch rechte Atrium (grün) besitzt ein großes, schnauzenförmiges Herzohr während das linke Atrium (orange) ein geweihförmiges Herzohr besitzt; der Sinusknoten (gelb) befindet sich in der Wand des rechten Atriums. **B** atrialer Situs inversus; **C** rechtsseitige atriale Isomerie und **D** linksseitige atriale Isomerie. Modifiziert nach Ho SY et al. 1995, S. 441.

Die oben genannten Verhältnisse für die Lungen und das Herz stellen die theoretisch zu erwartenden Reinstformen der viszeralen Isomerien dar. Tatsächlich finden sich jedoch

beim linksseitigen Isomerismus, auch als *Polysplenie-Syndrom* bezeichnet, und beim rechtsseitigen Isomerismus, auch als *Asplenie-Syndrom* bezeichnet, häufig Vermischungen von Symptomen beider Syndrome. Es ist somit nicht immer möglich, die beiden Syndrome streng voneinander abzugrenzen (Bartram et al. 2005). Um der Komplexität der Materie gerecht zu werden, sollte man daher beim Vorliegen einer Heterotaxie pauschalisierende patho-morphologische Klassifikationen wie Linksisomerie/Polysplenie und Rechtsisomerie/Asplenie vermeiden und stattdessen eine detaillierte Beschreibung der morphologischen Situation jedes einzelnen Organs vornehmen (Jacobs et al. 2007). Für die morphologische Klassifizierung des atrialen Situs hat es sich hierbei bewährt, die Gestalt der Herzohren als Kriterium heranzuziehen. Man spricht daher korrekterweise nicht von atrialen Isomerien, sondern von Isomerien der Herzohren (Jacobs et al. 2007).

1.2 Molekulare Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse

Entwicklungsbiologische Studien der letzten fünfzehn Jahre haben gezeigt, dass die Entwicklung der viszeralen Rechts/Links-Asymmetrien durch molekulare Signalkaskaden gesteuert wird, die die rechts- und linksseitigen Körperidentitäten während der frühen Embryonalentwicklung festlegen (Abb. 3). Diese Entwicklung scheint bei allen Vertebraten in drei aufeinander folgenden Phasen abzulaufen (für Übersichtsartikel siehe z.B. Levin und Mercola 1998; Levin 2006): (1.) In der initialen Phase erfolgt die Brechung der ursprünglich bilateralen Symmetrie des Embryos. Als Folge dieses Symmetriebruches kommt es zu bilateral asymmetrischen Verteilungen von Signalmolekülen (z.B. Sonic hedgehog) im Bereich des Organisators/Hensen-Knoten. (2.) In der darauf folgenden Phase werden die zunächst noch auf den Bereich des Organisators lokalisierten Rechts/Links-„Informationen“ über Signalkaskaden verstärkt und breiten sich innerhalb des rechts- und linksseitigen Mesoderms aus. Diese Signalkaskaden induzieren die unilaterale Expression des Transkriptionsfaktors *Pitx2* im linken Seitenplattenmesoderm. (3.) In der abschließenden Phase erfolgt die Umsetzung der durch die Signalkaskaden induzierten molekularen Rechts/Links-Asymmetrien (z.B. linksseitige *Pitx2* Expression) in gestaltliche und funktionelle Rechts/Links-Asymmetrien der inneren Organe und des Gehirns.

Während die Komponenten und der Ablauf der Rechts/Links-Signalkaskaden heute schon relativ gut bekannt sind, ist derzeitig noch nicht hinreichend geklärt, welche Mechanismen zum Bruch der ursprünglichen Symmetrie des Embryos führen (Wolpert et al. 2007) und wie die asymmetrische Genexpression zur Entwicklung der gestaltlichen und funktionellen Asymmetrien der inneren Organe und des Gehirns führt.

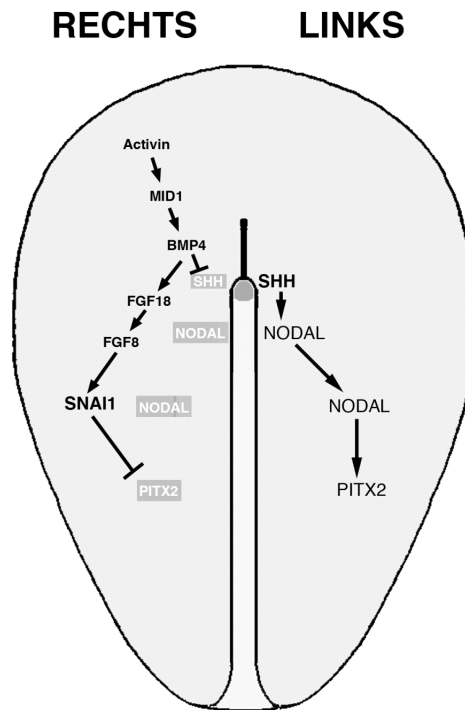


Abb. 3: Stark vereinfachte schematische Darstellung der Rechts/Links-Signalkaskaden beim Hühnerembryo während der Gastrulation. Über ein rechtsseitiges Activin-Signal wird eine rechtsseitige Expression von BMP4 (bone morphogenetic protein) im Hensen-Knoten induziert. BMP4 unterdrückt die rechtsseitige Expression von SHH (sonic hedgehog), wodurch SHH nur noch im linken Teil des Hensen-Knotens exprimiert wird. Linksseitige Expression von SHH induziert die Expression von NODAL in der Nähe des Hensen-Knotens. NODAL diffundiert ins linke Seitenplattenmesoderm, wo es die Expression von NODAL induziert. NODAL-Expression im Seitenplattenmesoderm induziert die Expression des Transkriptionsfaktors PITX2. Auf der rechten Seite induziert BMP4 die Expression von FGF8 (fibroblast growth factor) über FGF18. FGF8 wiederum induziert die Expression des Antagonisten SNAI1, der die Expression von PITX2 auf der rechten Seite unterdrückt.

1.3 Das Proepikard

Der frühembryonale Herzschlauch besteht lediglich aus zwei Zellschichten. Außen befindet sich das primitive Myokard und innen das primitive Endokard. Beide Zellschichten sind durch eine zellfreie Schicht aus extrazellulärer Matrix, die als „Cardiac jelly“ bezeichnet wird (Davis 1924), miteinander verbunden. Weitere strukturelle Komponenten des reifen Herzens wie zum Beispiel das Epikard, das kardiale Interstitium oder die Koronargefäße, sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden. Bis in die späten 1960er Jahre ging man davon aus, dass sowohl das Epikard als auch das Myokard vom primitiven embryonalen Myokard abstammen und bezeichnete letzteres deshalb auch als *Myoepikard* (Mollier 1906). Untersuchungen der vergangenen vier Jahrzehnte haben jedoch gezeigt, dass das Epikard aus einer primär extrakardial gelegenen Vorläuferzellpopulation stammt, die als *Proepikard* (PE) oder auch als *proepikardiale Serosa* bezeichnet wird (Viragh und Challice 1981; Viragh et al. 1993; Männer 1999; Männer et al. 2001). Beim PE handelt es sich um Mesothelbläschen oder Mesothelzotten, die sich in der Wand der Perikardhöhle in der Nähe des venösen Pols des embryonalen Herzens bilden.

1.3.1 Transfer der Proepikardzellen zum Herzen

Es sind zwei Mechanismen bekannt, über die PE-Zellen das embryonale Herz besiedeln. Der erste Mechanismus erfolgt in Form von frei flottierenden, vesikulären Zellhaufen. Er scheint hauptsächlich bei Fisch- und Säugerembryonen vorzukommen (Komiyama et al. 1987; Kuhn und Liebherr 1988; Muñoz-Chápuli et al. 1997). Die zottenförmigen Ausstülpungen des voll ausgebildeten PE bestehen aus abgeflachten Mesothelzellen und enthalten Mesenchymzellen sowie extrazelluläre Matrix (Viragh und Challice 1981; Komiyama et al. 1987; Kuhn und Liebherr 1988; Hirakow 1992). Die mesothelialen Zellen schnüren sich zu vesikulären Zellhaufen ab, die passiv durch die flüssigkeitsgefüllte Perikardhöhle treiben und an der nackten Myokardoberfläche haften bleiben (Männer et al. 2001). Die anhaftenden Vesikel flachen sich ab und bilden zunächst Epikardinseln aus, die dann nach und nach zu einer durchgehenden Epikardschicht zusammenwachsen.

Der zweite Mechanismus beruht auf der Ausbildung einer Gewebebrücke zwischen dem PE und der Hinterwand der sich entwickelnden Ventrikel. Von der Anhaftungsstelle dieser Gewebebrücke am Ventrikel ausgehend breitet sich das primitive Epikard kontinuierlich über die Myokardoberfläche aus (Männer 1992; Männer et al. 2001). Dieser Mechanismus wird hauptsächlich bei Vogel- und Reptilienembryonen gefunden (Männer et al. 2001).

1.3.2 Derivate des Proepikards

Wie bereits beschrieben bilden die PE-Zellen nach ihrem Transfer auf die „nackte“ Myokardoberfläche zunächst das primitive Epikard (Ho E und Shimada 1978; Virágh und Challice 1981; Hiruma und Hirakow 1989; Männer 1992). Durch epithelial-mesenchymale Transition primitiver Epikardzellen entstehen Mesenchymzellen, die zuerst das Subepikard und im Anschluss daran die myokardialen und subendokardialen Schichten der Herzwand besiedeln (Gittenberger-de Groot et al. 1998; Männer 1999). Diese mesenchymalen Zellen liefern nahezu alle zellulären Elemente des kardialen Interstitiums sowie sämtliche Zellen des koronaren Blutgefäßsystems (Mikawa und Fishman 1992; Mikawa und Gourdie 1996; Dettman et al. 1998; Männer 1999; Landerholm et al. 1999; Wada et al. 2003; Pérez-Pomares et al. 2002). Die Differenzierung von proepikardialen Vorläuferzellen zu Endothelzellen der kardialen Lymphgefäße konnte ausgeschlossen werden (Wilting et al. 2007), ebenso wie die Differenzierung zu Herzmuskelzellen (Mikawa und Gourdie 1996; Gittenberger-de Groot et al. 1998; Männer 1999). Jedoch spielen Derivate des PE (Epikard, kardiales Interstitium, Koronarendothel) wichtige modulatorische Rollen bei der Entwicklung des embryonalen Myokards (Männer 2006).

1.3.3 Lageentwicklung des Proepikards

Frühere Befunde legten nahe, dass sich das Proepikard als ein einzelnes, unpaares Mittelliniengebilde ausbildet (Kurkiewicz 1909; Virágh und Challice 1981; Komiyama et al. 1987; Männer 1992; Virágh et al. 1993). Neuere Befunde zeigen jedoch, dass bei verschiedenen Wirbeltieren bilateral paarige PE-Anlagen gebildet werden (Muñoz-Chápuli et al. 1997; Männer et al. 2001; Schulte et al. 2007; Pombal et al. 2008; Serluca 2008). Interessanterweise zeigt die weitere Entwicklung der PE-Anlagen artspezifische

Unterschiede. So entwickeln sich die PE-Anlagen bei Mäuseembryonen bilateral symmetrisch. Die zunächst voneinander getrennten Anlagen vereinigen sich im Verlauf der Entwicklung im Bereich der embryonalen Mittellinie zu einer zusammenhängenden proepikardialen Masse, die sowohl das rechte als auch das linke Sinushorn bedeckt (Schulte et al. 2007). Beim Hühnerembryo hingegen entwickeln sich die PE-Anlagen bilateral asymmetrisch. Es erscheint zuerst die rechte Anlage, bevor etwas später die linke Anlage sichtbar wird. Von diesen beiden Anlagen entwickelt lediglich die rechte das reife PE, während die linke zugrunde geht (Schulte et al. 2007).

Die Tatsache, dass sich das PE beim Hühnerembryo bilateral asymmetrisch entwickelt, lässt vermuten, dass dies in Abhängigkeit von der Rechts/Links-Achsenspezifizierung erfolgen könnte (Schulte et al. 2007). Die symmetrische Entwicklung des PE in anderen Tierarten wie z. B. der Maus scheint dem zwar auf den ersten Blick zu widersprechen, doch muss dies nicht unbedingt der Fall sein. So finden sich auch bei weiteren bilateral paarig angelegten Organen artspezifische Unterschiede in der Entwicklung, die zu symmetrischer oder asymmetrischer Ausbildung dieser Organe führen. Ein gut untersuchtes Beispiel sind die Ovarien. Diese entwickeln sich bei den meisten Wirbeltierarten in einem bilateral symmetrischen Muster, das zur Ausbildung von zwei funktionsfähigen Ovarien führt. Bei Vögeln hingegen findet sich typischerweise nur ein funktionsfähiges Ovar auf der linken Seite, während auf der rechten Seite lediglich ein rudimentärer und nicht funktionsfähiger Ootestis vorhanden ist (Mittwoch 1998). Untersuchungen an Hühnerembryonen haben gezeigt, dass die bilateral asymmetrische Entwicklung ihrer Ovarien von den oben genannten Rechts/Links-Signalwegen abhängig ist (Guioli und Lovell-Badge 2007; Ishimaru et al. 2008).

1.4 Der Pulmonalvenenstamm

Verschiedene Aspekte der Vorhofsentwicklung sind bis heute unklar oder strittig. Das betrifft zum Beispiel die Entwicklung des Mündungsabschnittes des Pulmonalvenenstammes (MPV). Der Pulmonalvenenstamm ist ein venöses Gefäß, das das Blut aus den rechten und linken Lungenvenen aufnimmt und normalerweise zum linken Vorhof führt. Bei vielen lungen-atmenden Wirbeltieren ist dieses Gefäß zeitlebens vorhanden, beim Menschen jedoch nur während der Embryonal- und frühen

Fetalphase, da es normalerweise in die dorsale Wand des linken Vorhofes einbezogen wird, wodurch die Lungenvenen direkt in den linken Vorhof münden (siehe Abb. 13.11 aus Sadler 2008 S. 230). Wie bereits beschrieben, sind Isomerien der Herzohren häufig mit typischen Lageanomalien der Lungenvenen-mündungen assoziiert (Smith et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass der Anschluss des Pulmonalvenenstammes an das Herz in Abhängigkeit von der oben beschriebenen Spezifizierung der Rechts/Links-Achse erfolgt.

1.4.1 Lageentwicklung des MPV

Obwohl im letzten Jahrhundert zahlreiche Untersuchungen zur Pulmonalvenenentwicklung durchgeführt wurden, konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden, wie der Anschluss des Pulmonalvenenstammes an den linken Vorhof erfolgt. Strittig ist hier vor allem, ob der MPV ursprünglich im primitiven Vorhof (Born 1889; Neill 1956; Van Praagh und Corsini 1969; Goor und Lillehei 1975; Los 1978; Webb et al. 1998, 2000, 2001; Soufan et al. 2004; Anderson et al. 2006) oder im Sinus venosus liegt (Fedorow 1910; Brown 1913; Buell 1922; Rosenquist 1971; Kutsche und van Mierop 1988; De Ruiter et al. 1995; Tasaka et al. 1996; Blom et al. 2001).

Ein weiterer bisher wenig beachteter Punkt betrifft die ursprüngliche Lage des MPV in Bezug auf die Rechts/Links-Achse. Bisher gingen die meisten Embryologen davon aus, dass der MPV aus einer unpaaren Endothelsprosse der Sinus- oder Vorhofswand hervorgeht. Strittig ist jedoch, ob diese auch als *Pulmonalvenengrube* bezeichnete Gefäßanlage ursprünglich in der Mittellinie liegt (Brown 1913; Auër 1948; Van Praagh und Corsini 1969; Webb et al. 1998; Wessels et al. 2000; Jongbloed et al. 2004) oder von Anfang an ein links gelegenes Gebilde ist (Born 1889; Neill 1956; Goor und Lillehei 1975; Los 1978; Tasaka et al. 1996). Die Situation wird zusätzlich durch Befunde von Reptilien und Vogelembryonen verkompliziert, die nahe legen, dass bei diesen Arten bilateral paarige Anlagen für den MPV angelegt werden, von denen sich lediglich die linke zum definitiven MPV entwickelt (Fedorow 1910; Buell 1922; Dor et al. 1987; Kutsche und Van Mierop 1988; Männer und Merkel 2007). So haben Männer und Merkel (2007) kürzlich gezeigt, dass die Pulmonalvenengrube bei Hühnerembryonen eine ovale Vertiefung in der Mittellinie des Embryos ist, deren Längsachse senkrecht zur Mittellinie verläuft. Diese ovale Vertiefung besteht aus einem

sichtbaren rechten und linken Anteil. Im Laufe der Entwicklung konnte beobachtet werden, dass sich der rechte Anteil zurückbildet, während sich der linke Anteil zum definitiven MPV entwickelt.

1.5 Erfolgt die Entwicklung des PE und des MPV in Abhängigkeit von der Spezifizierung der Rechts/Links-Achse?

Wie oben beschrieben, werden bei Hühnerembryonen sowohl für das PE (Schulte et al. 2007) als auch für den MPV bilateral paarige Anlagen gebildet (Männer und Merkel 2007). Diese Anlagen entwickeln sich normalerweise bilateral asymmetrisch, wobei sich das PE auf der rechten und der MPV auf der linken Seite ausbilden. Es liegt nahe zu vermuten, dass die bilateral asymmetrische Ausbildung dieser beiden Gebilde in direkter Abhängigkeit von der oben beschriebenen Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse erfolgt (Schulte et al. 2007; Männer und Merkel 2007). Um diese Vermutung experimentell zu prüfen, müsste die Spezifizierung der Rechts/Links-Achse an Hühnerembryonen in kontrollierter und vorhersagbarer Weise gestört werden. Dies ist derzeit nur in „Whole-Embryo“-Kulturen möglich. Leider erreichen derartig manipulierte Embryonen in der „Whole-Embryo“-Kultur nicht die Stadien, in denen die Entwicklung des PE und des MPV beobachtet werden kann. Deshalb müssten derartige Manipulationen *in ovo* durchgeführt werden. Derzeit sind jedoch keine zuverlässigen Methoden bekannt, die Veränderungen der Rechts/Links-Achsensspezifizierung *in ovo* zulassen.

Aus diesem Grund haben wir eine andere Wirbeltierart gesucht, an der wir experimentell überprüfen können, ob die asymmetrische Entwicklung des PE und des MPV von Rechts/Links-Signalen abhängig ist. Die Embryonen dieser Art sollen vier Voraussetzungen erfüllen: (1.) Manipulationen der Rechts/Links-Achsensspezifizierung sollen technisch möglichst einfach und reproduzierbar durchgeführt werden können; (2.) derartige Manipulationen sollen bis zu fortgeschrittenen Stadien der Herzentwicklung überlebt werden; (3.) die PE Entwicklung soll nach einem mit Hühnerembryonen vergleichbaren asymmetrischen Muster ablaufen; und (4.) die Lageentwicklung des MPV soll ebenfalls nach einem mit Hühnerembryonen vergleichbaren Muster ablaufen.

Von den derzeitig in der Entwicklungsbiologie bevorzugt verwendeten Modellorganismen scheiden die Maus und der Zebrafisch von vornherein aus. Bei beiden Arten erfolgt die PE-Entwicklung bilateral symmetrisch (Schulte et al. 2007; Serluca 2008). Darüber hinaus fehlt dem Zebrafisch ein Lungenkreislauf. Beobachtungen an Axolotlembryonen (*Ambystoma mexicanum*) lassen vermuten, dass sich das PE bei Amphibien nur auf der rechten Seite bildet (Fransen und Lemanski 1990). Der von uns gewünschte Modellorganismus könnte sich somit unter Amphibienarten finden. Der südafrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) ist die derzeitig in der Entwicklungsbiologie am häufigsten verwendete Amphibienart. Bei Xenopusembryonen lässt sich die Spezifizierung der Rechts/Links-Achse relativ einfach stören und die Embryonen überleben derartige Manipulationen bis in fortgeschrittene Stadien der Herzentwicklung. Bisher fehlen jedoch genaue Daten über die Entwicklung des PE und des Pulmonalvenenstammes bei *Xenopus*. Um beurteilen zu können, ob sich Xenopusembryonen zur experimentellen Prüfung der o.g. Frage eignen, muss daher noch geklärt werden, wie die Entwicklung des PE und des MPV bei dieser Art abläuft.

1.6 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll die Lageentwicklung des PE und des MPV bei Xenopusembryonen klären. Hierbei geht es im Besonderen um die Beantwortung folgender Fragen:

1. Entwickelt sich das PE als ein bilateral symmetrisches oder asymmetrisches Gebilde?
2. Liegt der MPV ursprünglich in der dorsalen Wand des Sinus venosus oder in der Wand des primitiven ungeteilten Vorhofes?
3. Liegt der MPV ursprünglich in der Mitte oder in der linken Hälfte des Sinus venosus/primitiven Vorhofes?
4. Gibt es Hinweise darauf, dass sich der MPV aus einer primär paarigen Anlage entwickelt?

2.0 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der Lageentwicklung der Proepikardanlage und der Lageentwicklung der Pulmonalvenenmündung bei Xenopusembryonen beschäftigt. Ich habe für meine Untersuchungen zunächst übliche Verfahren wie die mikroskopische Begutachtung histologischer Schnittserien und die Rasterelektronenmikroskopie verwendet. Da es mit diesen mikroskopischen Untersuchungsverfahren nicht möglich war, zweifelsfreie Aussagen über mögliche Paarigkeiten und Seitenidentitäten von Proepikard (PE) und dem Mündungsabschnitt des Pulmonalvenenstammes (MPV) machen zu können, wurde zusätzlich ein „Cell Lineage Tracing“ zur Identifizierung der Derivate der rechten und linken Körperhälfte durchgeführt (siehe unten; Ramsdell et al. 2005).

2.1 Embryonen

Die Untersuchungen wurden an Embryonen des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. T. Pieler, Abteilung Entwicklungsbiochemie, Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften zur Verfügung gestellt wurden. Die befruchteten, mit 2%igem Cysteinhydrochlorid (pH 8) von der gallertigen Eihülle befreiten Eier wurden in einem handelsüblichen Inkubator (Mytrom WB22K) bei 18°C in „Modified Barth’s Solution“ (MBS) bebrütet, bis die Embryonen das Stadium 35 (nach Nieuwkoop und Faber (1967)) erreicht hatten. Anschließend haben sich die Embryonen bei Raumtemperatur weiterentwickelt.

Aufgrund der ausgeprägten Beweglichkeit lebender Xenopusembryonen erfolgte die lupenmikroskopische Begutachtung in narkotisiertem Zustand. Als Narkotikum wurde 20%iges Aminobenzoessäureethylestermethansulfonat (Fa. Sigma) verwendet, das im Verhältnis 1:2000 mit MBS verdünnt wurde. Für meine Untersuchungen wurden ausschließlich Embryonen verwendet, die keine äußerlich erkennbaren Fehlbildungen aufwiesen. Die Stadierung der Embryonen erfolgte auf der Grundlage des Stadierungssystems nach Nieuwkoop und Faber (1967), das sich an äußerlich sichtbaren morphologischen Merkmalen orientiert. Die untersuchten Embryonen befanden sich in

den Stadien 37 bis 46. Dieser Zeitraum wurde aufgrund bereits bekannter Expressionsdaten von proepikardialen Markergenen wie *Wt1* und *Pod1* gewählt. Die *Wt1* Expression soll im Herzen im Stadium 38/39 beginnen (Carroll und Vize 1996), die *Pod1* Expression im Stadium 40,5 (Simrick et al. 2005). Ab dem Stadium 46 hat das Herz von Xenopusembryonen in der Regel die adulten Verhältnisse erreicht (Lohr und Yost 2000; Warkman und Krieg 2007).

Im Folgenden wird zunächst die Herstellung der histologischen und der raster-elektronischen Präparate beschrieben und im Anschluss daran erläutert, wie das „Cell Lineage Tracing“ durchgeführt und die entsprechend markierten Embryonen für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung fixiert wurden.

2.2 Histologie

Für die histologische Untersuchung wurden die Embryonen in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach der Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Präparate über Xylol in Paraplast[®] überführt. Von diesen Präparaten wurden Schnittserien in frontaler, horizontaler oder sagittaler Ebene (Schnittdicke: 5-7 μm) angefertigt. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Daran schloss sich die Untersuchung der Schnittserien und die photographische Dokumentation der Befunde mit einem Lichtmikroskop (Axioplan 2, Fa. Zeiss) an.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden die narkotisierten Embryonen in eine mit MBS und Aminobenzoesäureethylestermethansulfonat (Verdünnung siehe oben) gefüllte Petrischale überführt, die am Boden mit einer Wachsschicht überzogen war. Mit Hilfe von Insektennadeln, die durch den Mund und den Schwanz gesteckt wurden, wurde der Embryo auf dem Boden der Petrischale in Rückenlage festgesteckt um ihn präparieren zu können. Die Embryonen, die für die Untersuchung des PE bestimmt waren, wurden hierbei überstreckt. Durch die Überstreckung des Embryos wird die Ventrikelschleife des Herzens nach kranial

verlagert und ein freier Blick auf den venösen Pol des Herzens ermöglicht (Schulte et al. 2007).

Dann wurde die vordere Körperwand mittels elektrolytisch gespitzter Wolframnadeln durchtrennt und die Perikardhöhle eröffnet. Die äußere Oberfläche des Herzens wurde über eine Glaskanüle mit Locke'scher Lösung gespült, um anhaftende Proteine von der Herzoberfläche zu entfernen.

Die oben beschriebenen ersten Präparationsschritte wurden sowohl für die Untersuchung der PE-Entwicklung als auch für die Untersuchung der Topogenese der PVM durchgeführt. Im folgenden Schritt unterscheidet sich jedoch das weitere Vorgehen:

Für die Untersuchung der PE-Entwicklung wurde das Herz mit einer kalziumfreien manganchloridhaltigen (20 mmol) Locke'schen Lösung (Asami 1979) mittels einer Glaskanüle äußerlich gespült. Manganchlorid bewirkt über eine Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle einen Herzstillstand in genereller Dilatation. Um regionale Kontraktionsunterschiede des Herzens zu verhindern und um die Herzen verschiedener Embryonen besser untereinander vergleichen zu können, ist es wichtig, sie in einheitlich dilatiertem Zustand zu fixieren. Nach dem Eintritt des Herzstillstandes wurden die Embryonen zunächst für 12 Stunden in 1,5% Glutaraldehyd in Locke'scher Lösung im Kühlschrank bei 7 ° C fixiert und anschließend in Bouin'scher Lösung bei Zimmertemperatur nachfixiert (Männer et al. 1996).

Für die Untersuchung der Topogenese der PVM mussten die Herzbinnenräume von Blut befreit werden. Hierzu wurde zunächst eine Kiemenbogenarterie eröffnet, um einen Austritt von Blut zu ermöglichen. Anschließend wurde das embryonale Herz im Ventrikelbereich mit einer elektrolytisch angespitzten Wolframnadel eröffnet, so dass eine Glaskanüle in den Ventrikel vorgeschoben werden konnte. Nun wurde das noch schlagende Herz mit Locke'scher Lösung solange gespült, bis die sichtbaren Blutbestandteile aus dem Herzen entfernt waren. Anschließend wurde das Herz mit der kalziumfreien manganchloridhaltigen (20 mmol) Locke'schen Lösung (Asami 1979) von innen gespült, so dass wie oben beschrieben ein Herzstillstand in genereller

Dilatation herbeigeführt wurde. Die Fixierung erfolgte wie oben beschrieben mit 1,5% Glutaraldehyd in Locke'scher Lösung und danach mit Bouin.

Nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Präparate nach der „Critical-Point“-Technik (CPD) über CO₂ getrocknet und anschließend mit Leitsilber auf Aluminiumträger aufgeklebt. Für die Untersuchung der PE-Entwicklung wurde die Perikardhöhle wenn nötig mittels elektrolytisch angespitzter Wolframnadel weiter eröffnet. Für die Untersuchung der Topogenese der PVM wurden der Ventrikel und die Ausflussbahn entfernt. Daraufhin wurden die Embryonen mit Gold-Palladium (Schichtdicke 40-50 nm, „Cool“ Sputtering System Type E5100, Polaron Equipment) bedampft. Die Untersuchung der Präparate und die photographische Dokumentation der Befunde erfolgten mit dem Rasterelektronenmikroskop (DSM 960, Fa. Zeiss).

Für die Untersuchung der Topogenese der PVM wurden die Herzen nach der ersten Dokumentation weiter präpariert. Hierbei wurden der Sinus venosus und das primitive Atrium von ventral eröffnet und ein Teil der Leberanlage entfernt, so dass nun ein Einblick in das primitive Atrium und den Sinus venosus möglich wurde. Die Präparate wurden erneut bedampft und mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

2.4 „Cell Lineage Tracing“ und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Die befruchteten und mit 2% Cysteinhydrochlorid von der Gallerthülle befreiten Eier wurden in MBS bis zum Zwei-Zell-Stadium (Stadium 2 nach Nieuwkoop und Faber (1967)) bei einer Temperatur von 18°C in einem handelsüblichen Inkubator (Mytrom WB22K) bebrütet. Im Zwei-Zell-Stadium entspricht die sichtbare Teilungsfurche der späteren Körpermittellinie des Xenopusembryos. Die beiden Blastomeren repräsentieren somit jeweils eine der beiden, d.h. die rechte oder linke, Körperhälften (Klein 1987; Masho 1990).

Für das „Cell Lineage Tracing“ wurden die Dextran-konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe, Alexa Fluor 647 (10.000 MW, anionic, fixable) und Oregon Green 488 (10.000 MW, anionic, lysine fixable; beide Fa. Invitrogen) verwendet (Ramsdell et al. 2005). Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe wurden in RNase-freiem Wasser gelöst (2,5mg/ml). Zur

Markierung von rechter und linker Körperhälfte der sich entwickelnden Embryonen wurden im Zwei-Zell-Stadium in die Marginalzone der einen Blastomere 4 nl des Alexa Fluor 647-Dextran mit einem Mikromanipulator (Pneumatic PicoPump PV 820, World Precision Instruments) injiziert und in die Marginalzone der anderen Blastomere 4 nl des Oregon Green 488-Dextran injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen bis zum Stadium 37 nach Nieuwkoop und Faber (1967) im Inkubator bei 18°C bebrütet, anschließend entwickelten sie sich bei Zimmertemperatur weiter.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden ausschließlich Embryonen verwendet, die im „whole mount“ ein eindeutiges Rechts/Links-Hemilabeling mit den o.g. Fluoreszenzfarbstoffen zeigten. Hierfür wurden die lebenden Embryonen vor der Fixierung mit Paraformaldehyd unter einer Stereolupe (Leica MZ 16 FA) auf halbseitige Fluoreszenz untersucht. Lediglich Embryonen, die ein eindeutiges Rechts/Links-Hemilabeling aufwiesen, wurden stadiert und anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Entwässerung der Präparate erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe. Daran schloss sich die Einbettung in Paraplast[®] an, die über das Zwischenmedium Xylol erfolgte. Von diesen Präparaten wurden histologische Schnittserien in frontaler oder horizontaler Schnittebene (Schnittdicke: 7 µm) angefertigt.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der histologischen Schnitte und die photographische Dokumentation der Befunde erfolgten mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (Leica TCS SP2 konfokales System, Leica DM IRE 2 inverses Mikroskop). Der Dextran-konjugierte Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green wurde mit einem Argon-Krypton-Laser mit der Wellenlänge 496 nm angeregt, und der Farbstoff Alexa Fluor wurde mit einem Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 633 nm angeregt. Die vom Photomultiplier gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden entsprechend der Fluoreszenz grün bzw. rot eingefärbt. Kontrast und Helligkeit der Aufnahmen wurden am PC mittels Adobe Photoshop[®] nachkorrigiert.

3.0 Befunde

3.1 Lageentwicklung des Proepikards

Die Entwicklung des Proepikards (PE) wurde während der Stadien 37 bis 46 nach Nieuwkoop und Faber (1967) untersucht.

In den Stadien 37 bis 40 zeigte das Mesothel an der Oberfläche von Septum transversum und ventraler Wand des Sinus venosus keine regionalen morphologischen Besonderheiten, die sich im Sinne von PE-Anlagen interpretieren lassen (Abb. 4).

Im Stadium 41 bildet das Mesothel der ventralen Wand des rechten Sinushorns eine zapfenförmige Ansammlung von Mesothelzellen, die aufgrund ihrer Lage und ihres weiteren Verhaltens als PE identifiziert werden konnte (Abb. 5, 6, 7). Ein entsprechend geformtes linksseitiges PE konnte zu diesem und auch zu keinem späteren Entwicklungszeitpunkt gefunden werden. Das rechtsseitige zapfenförmige PE wächst nach kranial und bekommt im späten Stadium 41 direkten Kontakt mit dem rechtsseitigen Teil der Herzscheife am Übergang vom Ventrikel zur Ausflussbahn (Abb. 5, 6, 7). Hierdurch entsteht eine strangförmige sekundäre Gewebebrücke, die den Transfer der PE-Zellen zum Herzen ermöglicht. Diese, im Folgenden als PE-Brücke bezeichnete Gewebebrücke, zeigt eine auffallende Ähnlichkeit zur PE-Brücke des Hühnerembryos (Abb. 8) Die PE-Zellen breiten sich nun von der PE-Brücke ausgehend über die nackte myokardiale Oberfläche des Herzens aus und bilden das primitive Epikard.

Die PE-Brücke ließ sich bis zum Stadium 46 als eigenständiges Herzband nachweisen und verschwand nicht, wie beim Hühnchen üblich (Männer 1992), durch Fusion mit der Herzwand. Aufgrund der hohen Transparenz der vorderen Körperwand kann die PE-Brücke auch im lebenden Xenopusembryo bis mindestens zum Stadium 46 von außen identifiziert werden (Abb. 9).

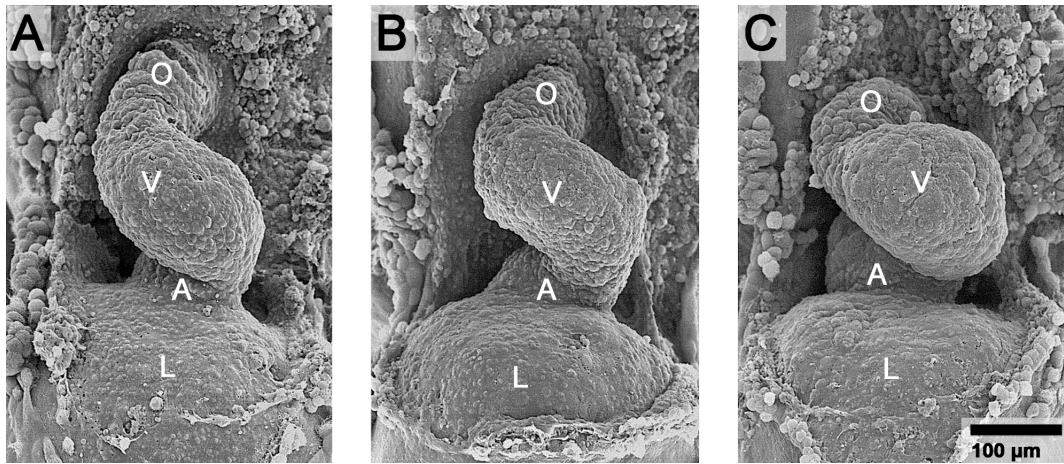


Abb. 4 A, B, C: Frontalansichten des Herzens in der eröffneten Perikardhöhle. Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Aufnahmen von Xenopusembryonen in den Stadien 37 (A), 38 (B) und 39 (C). Das Mesothel am Boden der Perikardhöhle zeigt keine auffälligen lokalen Unterschiede in der Oberflächenmorphologie. A = gemeinsames Atrium; L = Boden der Perikardhöhle / perikardiale Oberfläche der Leber; O = Ausflussbahn; V = embryonaler Ventrikel.

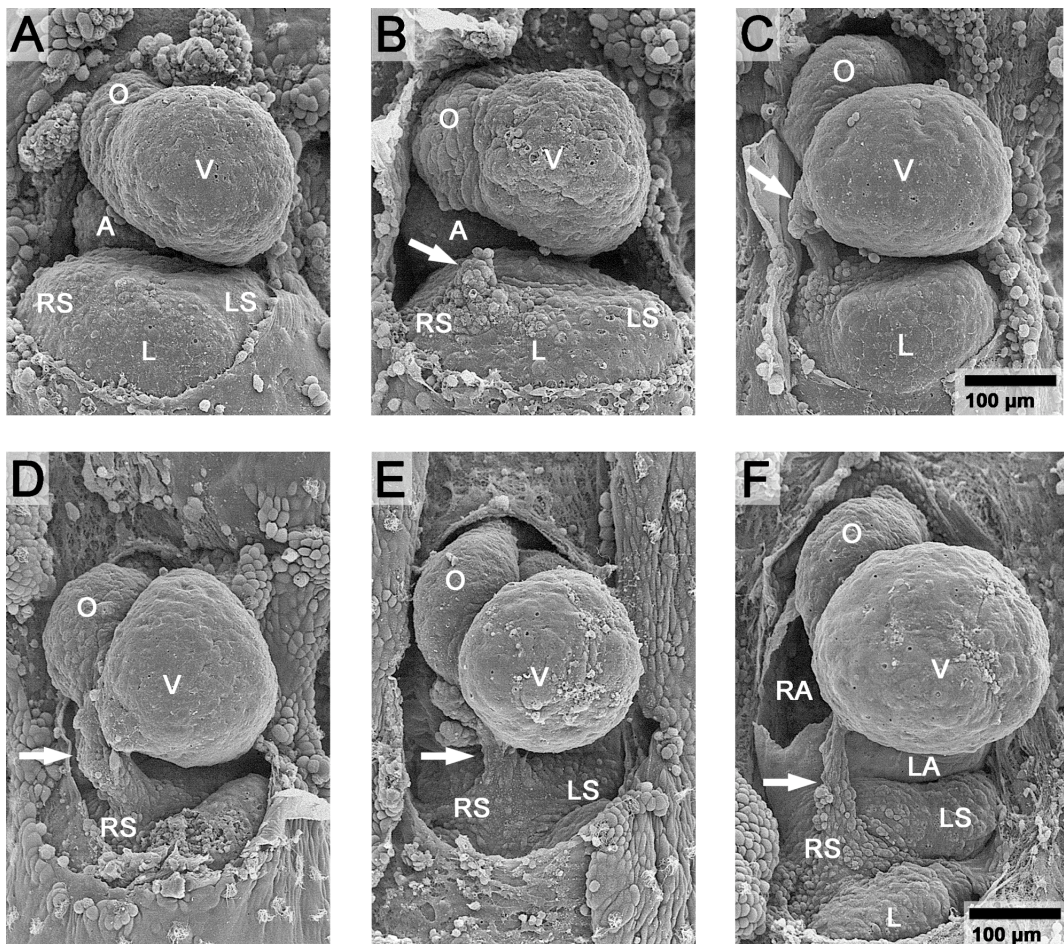


Abb. 5 A-F: Frontalansichten des Herzens in der eröffneten Perikardhöhle. REM-Aufnahmen von Xenopusembryonen in den Stadien 40 (A); 41 (B, C); 42 (D); 43 (E) und 44 (F). Innerhalb des Stadiums 41 bildet das Mesothel im Bereich des rechten Sinushorns eine kegelförmige Ansammlung von Mesothelzellen, die in Richtung des sich entwickelnden Ventrikels wächst. Eine entsprechende Ansammlung von Mesothelzellen im Bereich des linken Sinushorns ist nicht zu erkennen. Der weiße Pfeil zeigt auf das PE bzw. die PE-Brücke. LA = linkes Atrium; LS = linkes Sinushorn; RA = rechtes Atrium; RS = rechtes Sinushorn; andere Abkürzungen wie in Abb. 4.

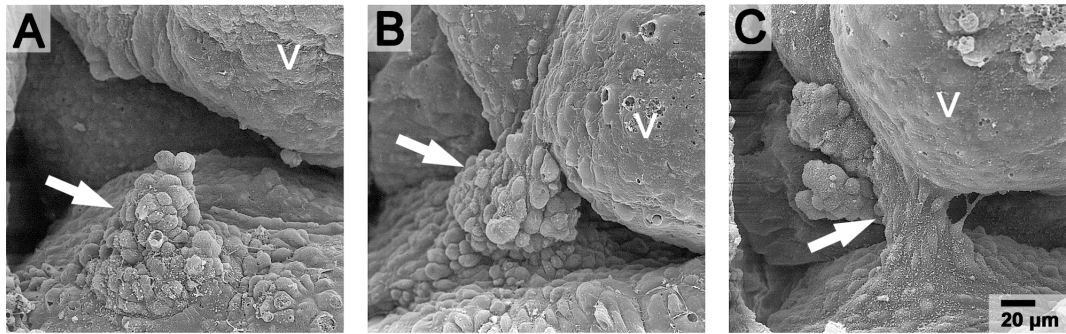


Abb. 6 A, B, C: Höhere Vergrößerung des Proepikards (PE) und der PE-Brücke in den Stadien 41 (A), 42 (B) und 43 (C). Der weiße Pfeil zeigt auf das PE bzw. die PE-Brücke. V = embryonaler Ventrikel.

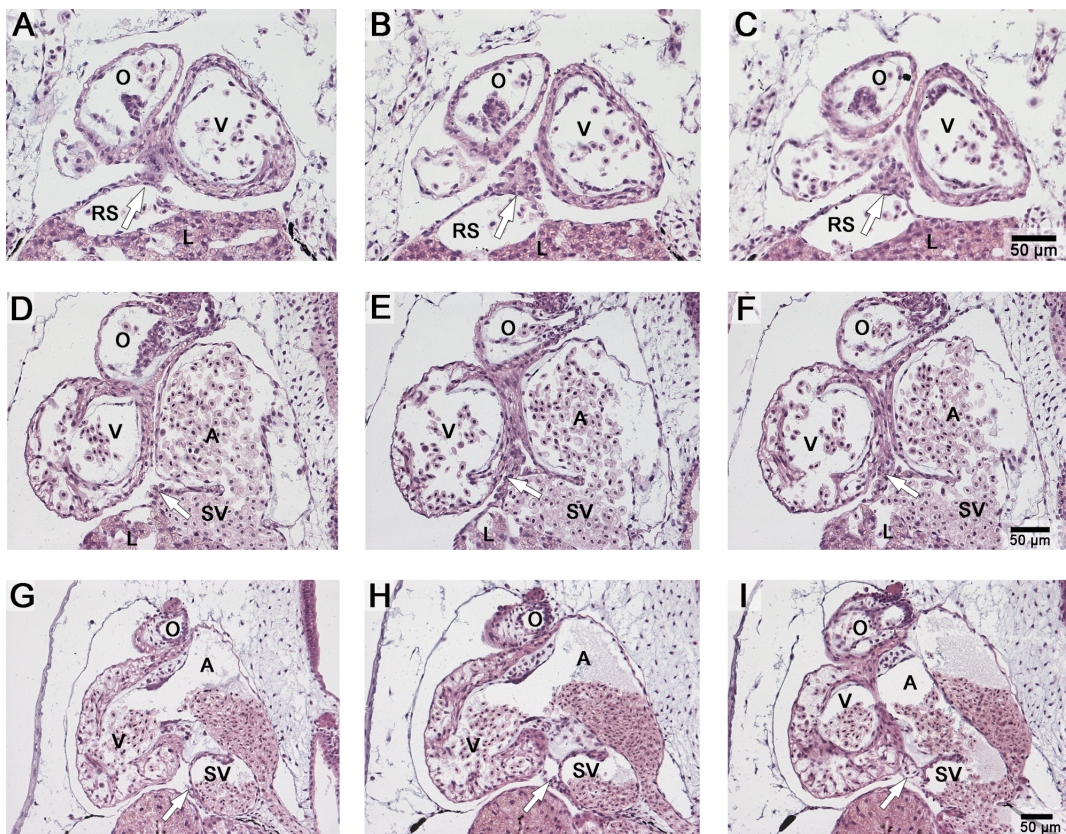


Abb. 7 A-I: Herz und PE-Brücke in einer frontalen (A-C) und zwei sagittalen (D-I) histologischen Schnittserien. Die Abb. A-C zeigen einen Embryo im Stadium 41; D-F im Stadium 43 und G-H im Stadium 46. Die PE-Brücke (weißer Pfeil) verläuft von der ventralen Wand des Sinus venosus zur Hinterwand des Ventrikels durch die Perikardhöhle. SV = Sinus venosus; andere Abkürzungen wie in Abb. 4 und Abb. 5.

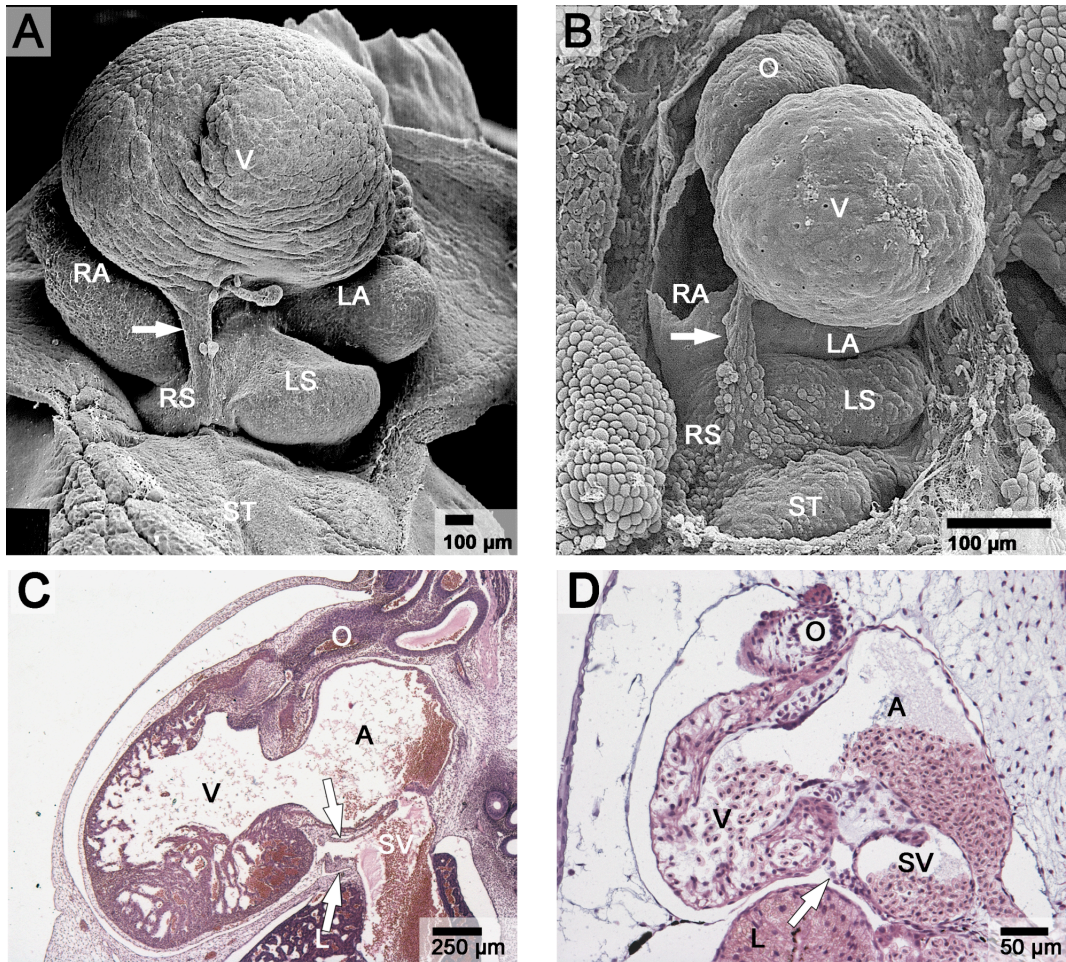


Abb. 8 A-D: Form und Lage der PE-Brücke bei Hühnerembryonen (A, C; Stadium 27 nach Hamburger und Hamilton) und Xenopusembryonen (B, D; Stadium 44 und 46). Die Abbildungen A und B zeigen REM-Aufnahmen, die Abbildungen C und D sagittale histologische Schnitte. Die Embryonen für die REM-Untersuchung wurden in einem überstreckten Zustand fixiert, sodass der Ventrikel nach kranial verlagert wird und ein freier Blick auf den venösen Pol des Herzens möglich wird. Die PE-Brücke (weißer Pfeil) verläuft von der ventralen Wand des Sinus venosus zur Hinterwand des(r) Ventrikel(s) durch die Perikardhöhle. In der PE-Brücke des Hühnerembryos (C; zwei weiße Pfeile) verläuft eine Vene, die das Blut der Koronarvenen in den Sinus venosus leitet. ST = Septum transversum; andere Abkürzungen wie in Abb. 4 und Abb. 5.

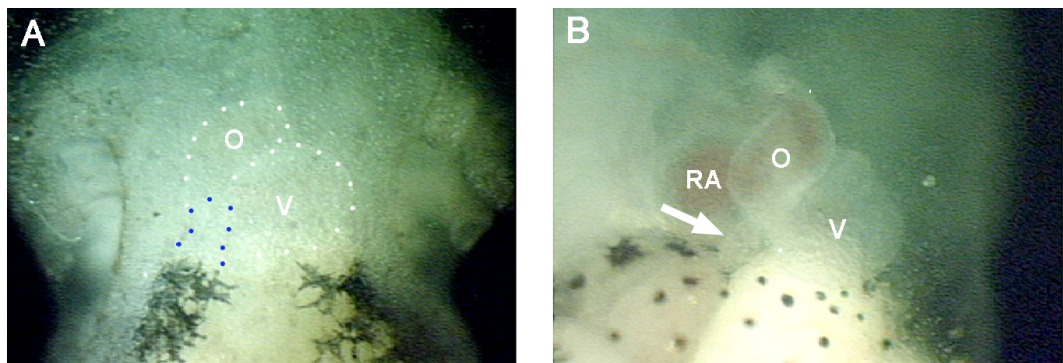


Abb. 9 A, B: Diese lupenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Frontalansichten des Herzens und der PE-Brücke, wie sie im lebenden Xenopusembryo durch die transparente Körperwand gesehen werden. A zeigt einen Embryo im Stadium 41. Die blau gepunktete Linie begrenzt den Rand der PE-Brücke, die weiß gepunktete Linie markiert die Herzkontur. B zeigt einen Embryo im Stadium 46. Der weiße Pfeil zeigt auf die PE-Brücke. O = Ausflussbahn; RA = rechtes Atrium; V = embryonaler Ventrikel.

Histologische Untersuchungen zeigen, dass das zapfenförmige PE und die PE-Brücke anfänglich lediglich aus einer morphologisch einheitlich erscheinenden Zellpopulation epithelartiger Zellen bestehen (Abb. 10). Die PE-Brücke enthält zu diesem Zeitpunkt weder extrazelluläre Matrix noch mesenchymale Zellen. Ab dem Stadium 43 jedoch zeigt die PE-Brücke einen mesenchymalen Kern, der von einem flachen Mesothel bedeckt ist.

Die oben genannten Befunde sprechen dafür, dass das PE bei Xenopusembryonen ausschließlich von einer rechtsseitigen PE-Anlage stammt. Damit würde die PE-Entwicklung in einem bilateral asymmetrischen Muster ablaufen, wie es auch von Hühnervögeln bekannt ist. Obwohl ich keinerlei Hinweis für eine linksseitige PE-Anlage gefunden habe, konnte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es bei Xenopus zu einem Verschmelzen der rechten und linken PE-Anlage kommt, bevor der morphologische Phänotyp sichtbar wird. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein „Cell Lineage Tracing“ mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, um zweifelsfreie Aussagen über die Seitenidentität der PE-Anlage machen zu können. Diese Untersuchungen zeigten, dass das PE beim Xenopusembryo ausschließlich von der rechten Körperhälfte stammt (Abb. 11).

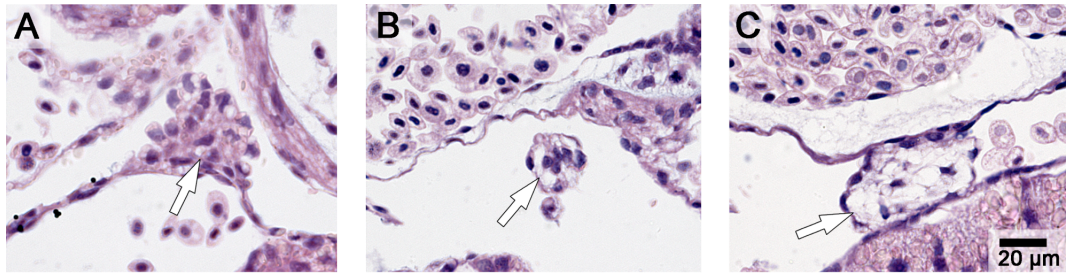


Abb. 10 A, B, C: Histologische Frontalschnitte, die den Aufbau der PE-Brücke von Xenopusembryonen in den Stadien 41 (A), 43 (B) und 46 (C) zeigen. Im Stadium 41 ist die PE-Brücke ein relativ kompaktes epitheliales Gebilde, das keine extrazelluläre Matrix und Mesenchymzellen enthält. Ab dem Stadium 43 erscheint die PE-Brücke als ein mesenchymaler Strang, der von einem flachen Mesothel bedeckt wird. Der weiße Pfeil zeigt auf die PE-Brücke.

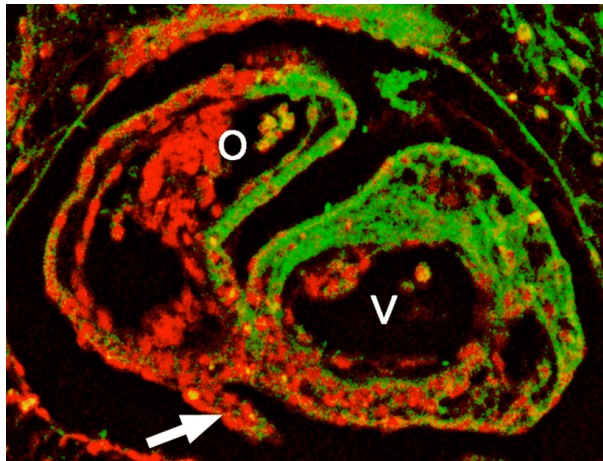


Abb. 11: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines histologischen Frontalschnittes zeigt die rechts- und linksseitigen Anteile, aus denen sich das Herz und die PE-Brücke bei einem Xenopusembryo im Stadium 43 zusammensetzt. Bei diesem Embryo wurde die rechte Blastomere im Zwei-Zell-Stadium mit Alexa-Fluor-647-konjugiertem Dextran markiert (rot), die linke Blastomere mit Oregon-Green-488-konjugiertem Dextran (grün). Die rote Markierung der PE-Brücke (weißer Pfeil) kennzeichnet deren Herkunft aus der rechten Blastomere. O = Ausflussbahn; V = embryonaler Ventrikel.

3.2 Lageentwicklung des Mündungsabschnittes des Pulmonalvenenstammes

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Lageentwicklung des Mündungsabschnittes des Pulmonalvenenstammes (MPV) untersucht, von dem angenommen wird, dass er wie das PE primär paarig angelegt wird und im weiteren Entwicklungsverlauf ein bilateral asymmetrisches Muster aufweist (Männer und Merkel 2007). Wie im Fall des PE erfolgte die Begutachtung der Embryonen in den Stadien 37 bis 46 nach Nieuwkoop und Faber (1967).

In den Stadien 37 bis 40 konnten keine morphologisch erkennbaren Anzeichen eines MPV gefunden werden.

Der MPV erscheint frühestens im Stadium 41, wo er bei 50% der rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Embryonen (4 von 8) als eine schlitzförmige Gefäßöffnung an der dorsalen Wand der Einstrombahn des Herzens gefunden wurde (Abb. 12). Histologische Schnittserien zeigen, dass sich der Pulmonalvenenstamm vor der Etablierung einer Gefäßöffnung als blind endendes Gefäß in der dorsalen Wand des Sinus venosus findet. Ab dem Stadium 42 war ein MPV bei allen Embryonen vorhanden. Vom Zeitpunkt seines ersten Erscheinens an findet sich der MPV links von der Körpermittellinie und kranial einer zirkulären Gewebeleiste, die das primitive Atrium vom Zusammenfluss der systemischen Venen – dem so genannten Sinus venosus – abgrenzt. Diese zirkuläre Gewebeleiste stellt die morphologische Grenze zwischen dem primitiven Atrium und dem Sinus venosus dar und wird daher im Folgenden als *sinu-atriale Grenzleiste* bezeichnet. Der MPV liegt somit von Anfang an im Bereich der dorsalen Wand des primitiven Atriums. Die Ebene, die durch die ringförmige *sinu-atriale Grenzleiste* definiert wird, entspricht nicht der horizontalen Körperebene des Embryos, sondern ist im Vergleich zu Letzterer nach dorso-kaudal geneigt (Abb. 13).

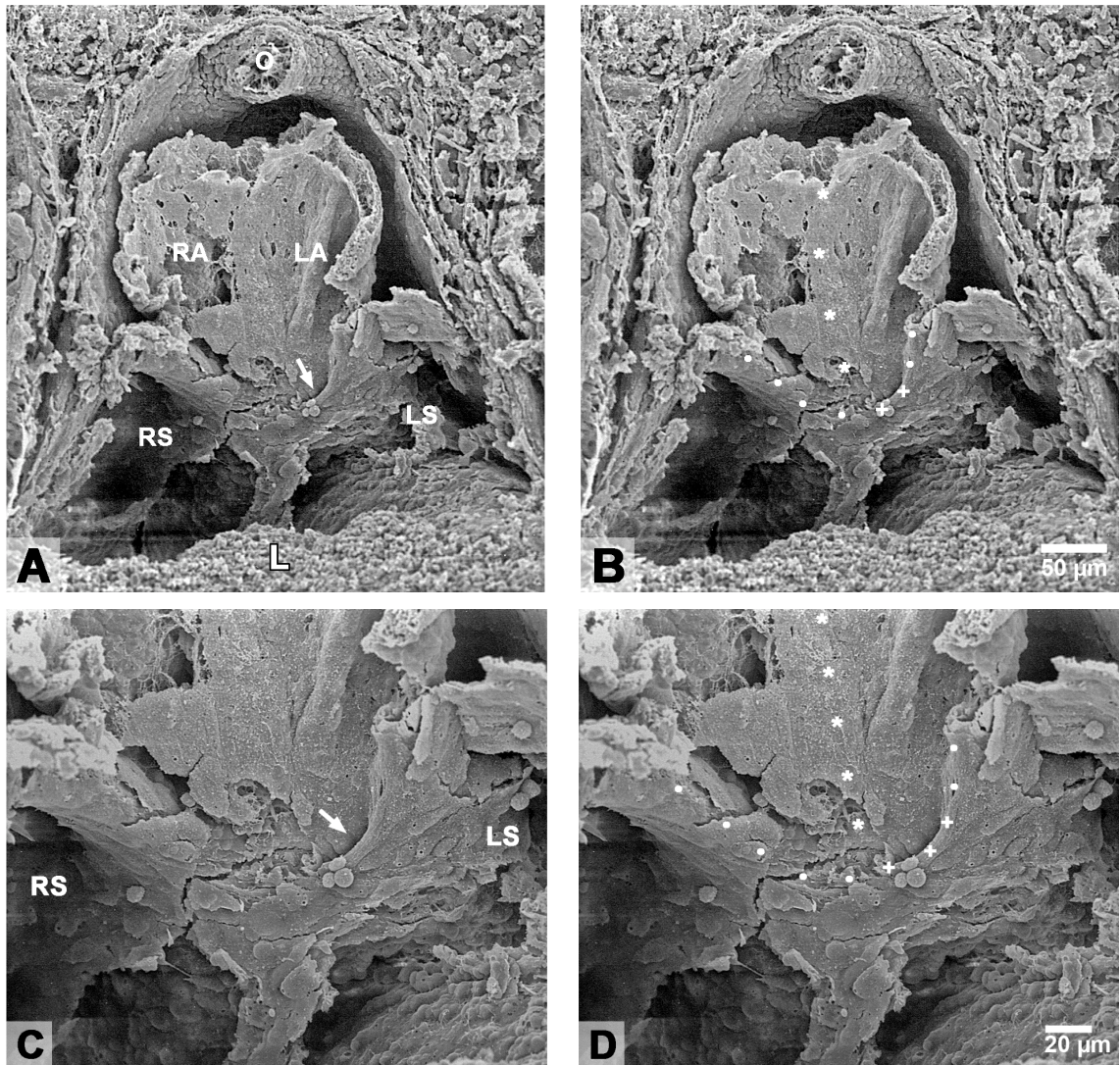


Abb. 12: Diese REM-Aufnahmen zeigen die dorsale Wand des eröffneten Sinus venosus und primitiven Vorhofes eines Xenopusembryos im Stadium 41 in der Ansicht von ventral. **A, B** Übersichtsaufnahmen. **C, D** Detailsichten. Bei diesem Embryo findet sich bereits ein MPV (weißer Pfeil). Dieser liegt kranial von der sinu-atrialen Grenzleiste und der Pulmonalfalte und links von der interatrialen Leiste. Das Leisten- und Falten-system ist in den rechten Abbildungen (**B, D**) durch Markierungen hervorgehoben. . . . = sinu-atriale Grenzleiste; +++ = Pulmonalfalte; *** = interatriale Leiste; L = Leber; LA = linkes Atrium; LS = linkes Sinushorn; O = Ausflussbahn; RA = rechtes Atrium; RS = rechtes Sinushorn.

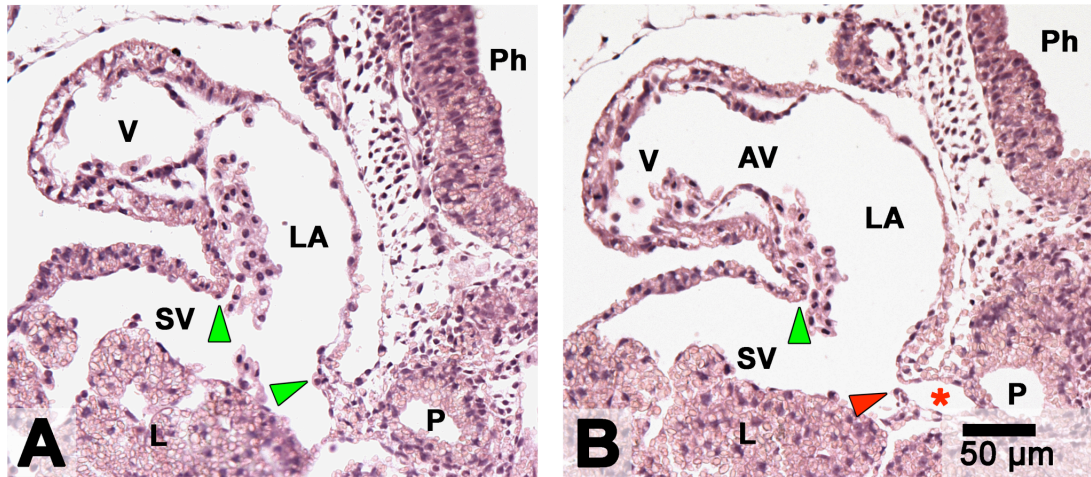


Abb. 13: Histologische Sagittalschnitte eines Xenopusembryos im Stadium 41 (Schnittrichtung von Links nach Rechts). Beachte, dass die durch die sinu-atriale Grenzleiste (grüne Pfeilspitzen) definierte Ebene gegenüber der Horizontalebene deutlich nach dorso-kaudal gekippt ist. Im Bereich des MPV (rotes Sternchen) wird die sinu-atriale Grenzleiste durch den freien Rand der Pulmonalfalte (rote Pfeilspitze) fortgesetzt. AV = AV-Kanal; L = Leber; LA = linkes Atrium; P = Lungenanlage; Ph = Pharynx; SV = Sinus venosus; V = Ventrikel.

Bei seinem Erscheinen im Stadium 41 wird der MPV kaudal von einer dünnen, scharfrandigen Falte begrenzt, deren freier Rand dem Verlauf der sinu-atrialen Grenzleiste folgt (Abb. 12 und 13). Diese Falte wird im Folgenden als *Pulmonalfalte* bezeichnet. Ihr freier Rand setzt sich links in die relativ scharfkantige linke Hälfte der sinu-atrialen Grenzleiste fort, während sie rechts im Bereich der Körpermitte in die relativ stumpfe rechte Hälfte der sinu-atrialen Grenzleiste ausläuft. Hier steht das rechte Ende der Pulmonalfalte zusätzlich mit dem kaudalen Ende einer flachen, annähernd vertikal verlaufenden Leiste in Verbindung, bei der es sich um eine Teilanlage des späteren Septum interatriale handelt. Diese Leiste liegt annähernd in der Medianebene des Körpers und wird im Folgenden als *interatriale Leiste* bezeichnet (Abb. 14). Der MPV liegt somit von Anfang an links vom späteren Septum interatriale. Dies konnte auch durch „Cell Lineage Tracing“ bestätigt werden (Abb. 15).

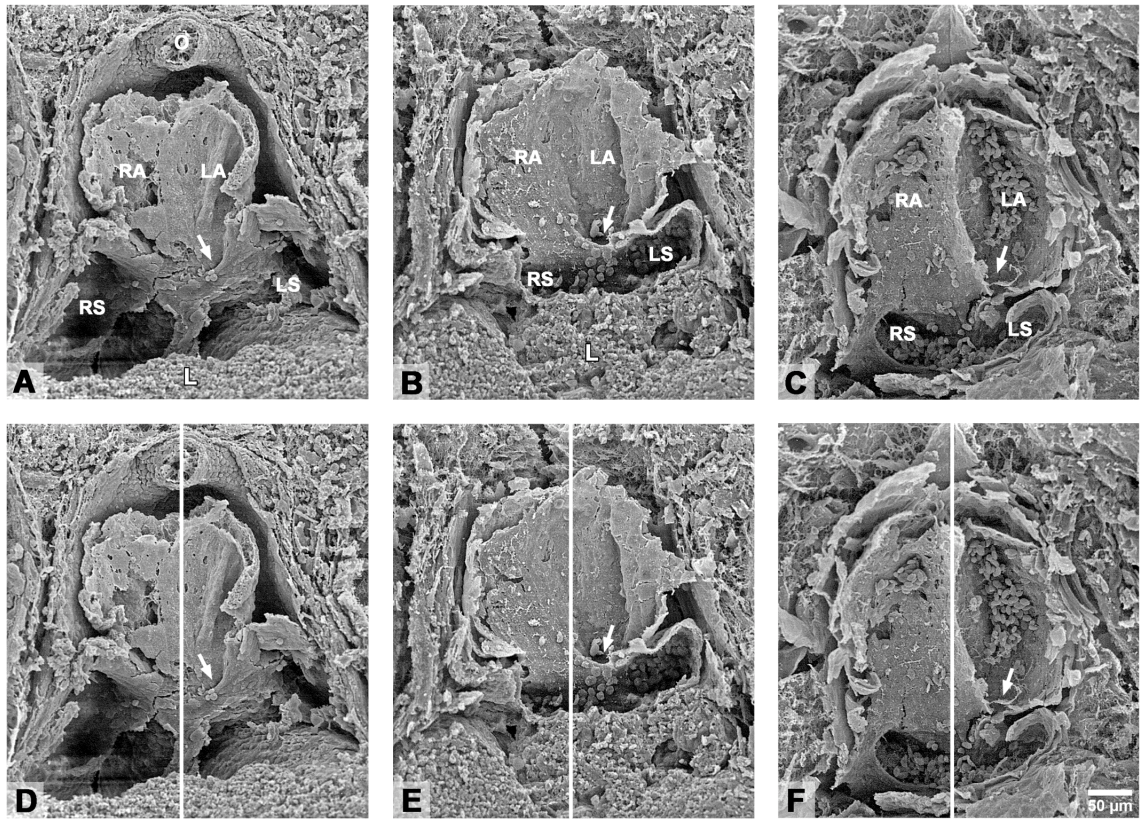


Abb. 14: Diese REM-Aufnahmen zeigen die dorsale Wand des eröffneten Sinus venosus und primitiven Vorhofes von Xenopusembryonen in den Stadien 41 (A, D), 42 (B, E) und 46 (C, F) in der Ansicht von ventral. Beachte, dass der MPV (weißer Pfeil) bei seinem Erscheinen im Stadium 41 kranial von der sinu-atrialen Grenzleiste und links von der interatrialen Leiste und der Körpermittellinie liegt. Zur Verdeutlichung der Lagebeziehung des MPV zur Körpermittellinie wurde letztere als weiße Linie in die Abbildungen D, E und F eingefügt. L = Leber; LA = linkes Atrium; LS = linkes Sinushorn; O = Ausflussbahn; RA = rechtes Atrium; RS = rechtes Sinushorn.

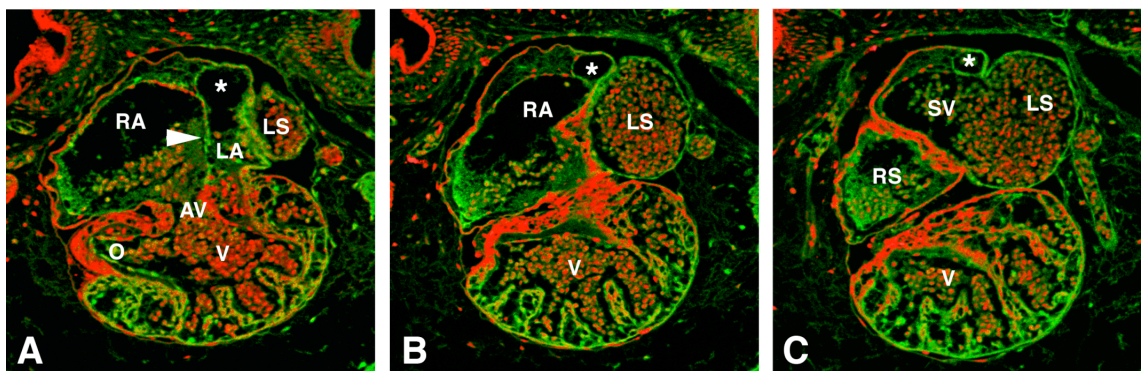


Abb. 15: Diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von histologischen Horizontalschnitten (in kranio-kaudaler Abfolge) zeigen die rechts- und linksseitigen Anteile, aus denen sich das Herz bei einem Xenopusembryo im Stadium 46 zusammensetzt. Bei diesem Embryo wurde die rechte Blastomere im Zwei-Zell-Stadium mit Alexa-Fluor-647-konjugiertem Dextran markiert (rot), die linke Blastomere mit Oregon-Green-488-konjugiertem Dextran (grün). Die Wand des MPV (*) stammt aus der linken Blastomere und liegt links vom Septum interatriale (weißer Pfeil), das ebenfalls aus der linken Blastomere stammt (grün). Beachte auch die linksseitige (grün) Herkunft der ventralen und die rechtsseitige (rot) Herkunft der dorsalen Wand des Ventrikels. LA = linkes Atrium; LS = linkes Sinushorn; O = Ausflussbahn; RA = rechtes Atrium; RS = rechtes Sinushorn; V = embryonaler Ventrikel.

Im Stadium 42 zeigt der freie Rand der Pulmonalfalte einen schrägen Verlauf. Dies kommt dadurch zustande, dass sein rechtes Ende nun nicht mehr mit der rechten Hälfte der sinu-atrialen Grenzleiste in Verbindung steht, sondern sich nach kranial direkt in die interatriale Leiste fortsetzt (Abb. 16 A, D). Das linke Ende der Pulmonalfalte geht jedoch weiterhin in die linke Hälfte der sinu-atrialen Grenzleiste über.

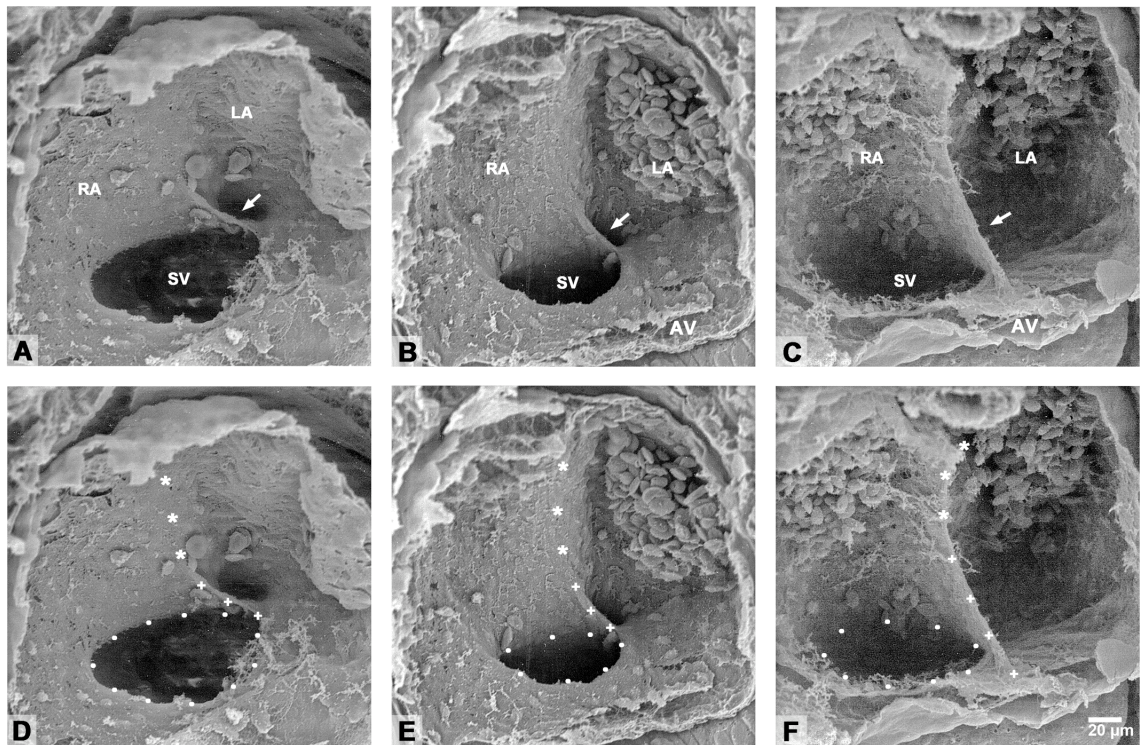


Abb. 16: Diese REM-Aufnahmen zeigen den eröffneten primitiven Vorhof von Xenopusembryonen in den Stadien 42 (A, D), 43 (B, E) und 46 (C, F) in der Ansicht von ventral-kranial. Ab dem Stadium 42 bildet die Pulmonalfalte eine Einheit mit der scharfrandigen, ins atriale Lumen vorwachsenden interatrialen Leiste und beteiligt sich somit an der Bildung des Septum interatriale. Der Verlauf des freien Randes der Pulmonalfalte wird zunehmend steiler. Das linke Ende der Pulmonalfalte wächst während dieses Zeitraumes entlang des linken Umfanges der sinu-atrialen Grenzleiste nach ventral auf das dorsale Atrioventrikular-Kissen zu. Hierdurch wird der Sinus venosus vom linken Vorhof getrennt. Die Körpervenen münden nun ausschließlich in den rechten Vorhof, der MPV (weißer Pfeil) in den linken Vorhof. Durch die vollständige Entwicklung des Septum interatriale wird die Trennung zwischen rechtem und linkem Vorhof erreicht. Das Leisten- und Faltensystem ist in den Abbildungen D, E, F durch Markierungen hervorgehoben. . . . = sinu-atriale Grenzleiste; +++ = Pulmonalfalte; *** = interatriale Leiste; AV = dorsales AV-Kissen; LA = linkes Atrium; RA = rechtes Atrium; SV = Sinus venosus.

In den Stadien 43 bis 46 wird der Verlauf des freien Randes der Pulmonalfalte zunehmend steiler. Die Pulmonalfalte bildet nun eine Einheit mit der scharfrandigen, ins atriale Lumen vorwachsenden interatrialen Leiste und beteiligt sich somit an der Bildung des Septum interatriale (Abb. 16 B, E), welches dem Septum primum der Säugerembryonen entspricht. Histologische Schnitte zeigen, dass sich der atriale Wandaufbau rechts und links von der interatrialen Leiste deutlich voneinander unterscheidet. Während die dorsale Wand des zukünftigen rechten Vorhofes eine dicke Schicht extrazellulärer Matrix („Cardiac jelly“) zwischen Endo- und Myokard besitzt, liegen im Bereich des zukünftigen linken Vorhofes Endo- und Myokard direkt aneinander (Abb. 17). Das linke Ende der Pulmonalfalte wächst während dieses Zeitraumes entlang des linken Umfanges der sinu-atrialen Grenzleiste nach ventral auf das dorsale Atrioventrikular-Kissen zu (Abb. 16). Hierdurch wird der Sinus venosus vom linken Vorhof getrennt (Abb. 16 und 18). Die Körpervenen münden nun ausschließlich in den rechten Vorhof, die Pulmonalvenen in den linken Vorhof. Durch die vollständige Entwicklung des Septum interatriale, wird die Trennung zwischen rechtem und linkem Vorhof erreicht. Aufgrund der Vereinigung von Pulmonalfalte und interatrialer Leiste lässt sich der MPV nicht mehr klar vom linken Vorhof abgrenzen. Der Pulmonalvenenstamm erweitert sich kelchförmig und geht ohne erkennbare Grenze ins linke Atrium über (Abb. 18 B, C).

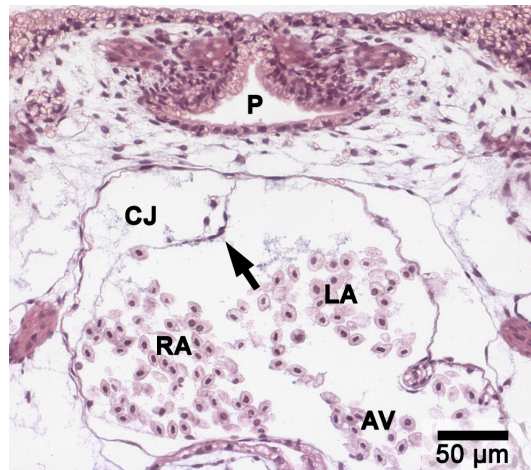


Abb. 17: Histologischer Horizontalschnitt durch den Vorhof eines Xenopusembryos im Stadium 43. Der schwarze Pfeil zeigt auf die interatriale Leiste. Beachte, dass sich der atriale Wandbau rechts und links von der interatrialen Leiste voneinander unterscheidet. Die dorsale Wand des rechten Vorhofes besteht aus Endo- und Myokard, sowie der dazwischen liegenden „Cardiac jelly“ (CJ). In der dorsalen Wand des linken Vorhofes liegen Endo- und Myokard direkt aneinander. AV = AV-Kanal; LA = linkes Atrium; P = Lungenanlage; RA = rechtes Atrium.

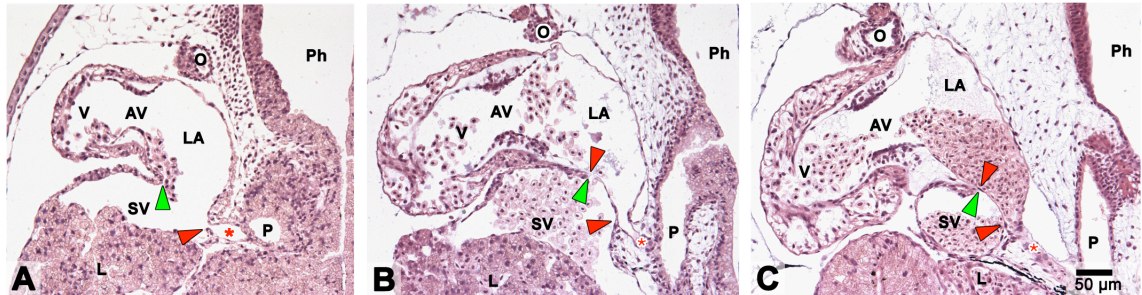


Abb. 18: Histologische Sagittalschnitte in Höhe des MPV. Xenopusembryonen in den Stadien 41 (A), 43 (B) und 46 (C). Im Stadium 41 bildet der freie Rand der Pulmonalfalte (rote Pfeilspitze in A) einen Teil der sinu-atrialen Grenzleiste (grüne Pfeilspitze in A). Durch Vorwachsen der Pulmonalfalte in Richtung des dorsalen AV-Kissens wird der Sinus venosus vom linken Vorhof getrennt (Bereich zwischen den roten Pfeilspitzen in B und C). Beachte, dass sich der MPV (roter Asterisk) kelchförmig ins linke Atrium erweitert. AV = AV-Kanal; L = Leber; LA = linkes Atrium; O = Ausflussbahn; P = Lungenanlage; Ph = Pharynx; SV = Sinus venosus; V = Ventrikel.

4.0 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um zwei Aspekte der Herzentwicklung von Xenopusembryonen zu klären:

1. die Lageentwicklung des Proepikards (PE) und
2. die Lageentwicklung des Mündungsabschnittes des Pulmonalvenenstammes (MPV).

Im Folgenden werden die Ergebnisse meiner Untersuchungen in Bezug auf diese beiden Aspekte nacheinander diskutiert.

4.1 Lageentwicklung des PE

Meine Untersuchung zur Entwicklung des PE bei Xenopusembryonen wurde durch Befunde angeregt, die bei Maus- und Hühnerembryonen gemacht wurden (Schulte et al. 2007). Bei beiden Organismen gibt es primär bilateral paarige PE-Anlagen, jedoch unterscheiden sich die beiden Spezies in der weiteren Entwicklung dieser PE-Anlagen. Bei Mausembryonen tragen sowohl die rechte als auch die linke PE-Anlage zur Bildung des definitiven PE bei. Sie entwickeln sich in einem bilateral symmetrischen Muster und verschmelzen zu einem gemeinsamen PE, das die Vorläuferzellen für das Epikard, das kardiale Interstitium und die Koronargefäße liefert. Bei Hühnerembryonen hingegen entsteht das PE lediglich aus der rechten PE-Anlage, während sich die linke PE-Anlage vollständig zurückbildet. Bei Hühnerembryonen erfolgt die PE-Entwicklung demnach **nicht** in einem bilateral symmetrischen, sondern in einem bilateral asymmetrischen Muster. Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob sich das PE bei Xenopus wie bei Mausembryonen in einem bilateral symmetrischen Muster oder wie bei Hühnerembryonen in einem bilateral asymmetrischen Muster entwickelt.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass sich das PE bei Xenopusembryonen lediglich auf der rechten Seite bildet. Die Entwicklung des PE erfolgt demnach in einem bilateral asymmetrischen Muster, welches der PE-Entwicklung beim Haushuhn ähnelt. Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Arten ist, dass das reife PE den Kontakt zum

Herzschlauch über eine strangförmige sekundäre Gewebebrücke herstellt. Diese Gewebebrücke ermöglicht den Transfer von PE-Zellen zum Herzen (Abb. 5, 6, 7, 8).

Es zeigten sich jedoch auch Unterschiede zum Hühnerembryo:

1. Beim Hühnerembryo werden molekular und morphologisch nachweisbare rechte und linke PE-Anlagen an der ventralen Wand des rechten und linken Sinushorns gebildet (Schulte et al. 2007). Von diesen beiden Anlagen entwickelt nur die Rechte den vollen PE-Phänotyp, die Linke geht zugrunde (Männer et al. 2001; Schlueter et al. 2006; Schulte et al. 2007). Bei Xenopusembryonen bildet sich eine PE-Anlage lediglich an der Wand des rechten Sinushorns, während auf der linken Seite keine morphologisch erkennbare PE-Anlage gefunden wird. Diese Tatsache erforderte ein „Cell Lineage Tracing“ um die ausschließlich rechtsseitige Herkunft des PE zu bestätigen (Abb. 11).

2. Das voll entwickelte PE von Hühnerembryonen ist eine Ansammlung mehrerer mesothelialer Zotten an der Wand des perikardialen Zöloms. Diese Zotten besitzen einen mesenchymalen Kern, der von einem flachen Mesothel bedeckt ist (Männer et al. 2001; Schulte et al. 2007). Das voll entwickelte PE von Xenopusembryonen jedoch imponiert als eine einzelne, zapfenförmige Ansammlung von Mesothelzellen, die keinen mesenchymalen Kern aufweist (Abb. 10 A). Mesenchym wird hier erst nach der Ausbildung der PE-Brücke gefunden (Abb. 10 B, C).

3. Beim Hühnerembryo kann die PE-Brücke nur vorübergehend als ein eigenständiges Gebilde gefunden werden, da sie mit dem Epikard des AV-Sulcus fusioniert (Männer 1992). Bei Xenopus und anderen Froscharten scheint die PE-Brücke jedoch als sog. „ventricular apical ligament“ das ganze Leben hindurch bestehen zu bleiben (Halpern und May 1958).

Aufgrund des Fehlens einer morphologisch identifizierbaren linken PE-Anlage, stellt sich die Frage, ob das PE von Xenopus als ein primär paarig angelegtes Gebilde angesehen werden kann. Die Tatsache, dass bei zahlreichen anderen Organismen, wie Hundshai, Maus, Huhn, Neunauge und Zebrafisch (Muñoz-Chápuli et al. 1997; Schulte et al. 2007; Pombal et al. 2008; Serluca 2008), morphologisch eindeutig zu identifizierende paarige PE-Anlagen gebildet werden, lässt vermuten, dass die PE-

Anlage bei *Xenopus* ebenfalls paarig angelegt wird. Es ist denkbar, dass die Entwicklung der linken PE-Anlage bei *Xenopus* zu einem so frühen Zeitpunkt stoppt, dass es zu keinem erkennbaren Zellwachstum kommt und damit eine morphologische Identifizierung der linken PE-Anlage nicht möglich ist. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll Expressionsanalysen von PE-Markergenen wie *Epicardin* (Hidai et al. 1998; Robb et al. 1998; Simrick et al. 2005), *Tbx18* (Kraus et al. 2001; Haenig und Kispert 2004) oder *WT1* (Moore et al. 1999; Carmona et al. 2001) durchzuführen, die zeigen könnten, ob es zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt bilaterale Expressionen von PE-Markergenen im Bereich des Sinus venosus gibt.

Haushuhn und *Xenopus* scheinen nicht die einzigen Arten zu sein, die eine rechtsseitige Dominanz der PE-Entwicklung aufweisen. Fransen und Lemanski (1990) haben die PE-Brücke bei Axolotlembryonen, (*Ambystoma mexicanum*), ebenfalls nur auf der rechten Seite der Perikardhöhle gefunden. Diese PE-Brücke bleibt bis in adulte Lebensphasen bestehen. Bei adulten Herzen verschiedener Amphibien, Reptilien und Eier legender Säuger existiert ein der PE-Brücke in Form und Lage entsprechender Gewebestrang (Hochstetter 1906, Halpern und May 1958). Dies lässt vermuten, dass die Ausbildung/Etablierung einer PE-Brücke aus dem rechten PE unter den Wirbeltieren weit verbreitet ist. Diese Vermutung wird auch durch neuere embryologische Befunde vom Hundshai, *Scyliorhinus canicula*, und Neunauge, *Petromyzon marinus*, gestützt (Pombal et al. 2008).

4.1.1 Ausblick

Die Tatsache, dass die Bildung des reifen PE bei einigen Fischen (Muñoz-Chápuli et al. 1997), Amphibien (Fransen und Lemanski 1990; vorliegende Befunde) und Vögeln (Männer et al. 2001; Schulte et al. 2007) nach dem gleichen bilateral asymmetrischen Muster erfolgt, wirft die Frage auf, ob die Lageentwicklung des PE bei diesen Spezies in direkter Abhängigkeit von der Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse erfolgt. Um diese Frage zu beantworten, könnte man die Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse im Embryo stören und anschließend die Entwicklung des morphologischen Phänotyps untersuchen. Obgleich derartige Experimente kürzlich an Hühnerembryonen durchgeführt wurden (Schlueter und Brand 2009), sind Hühnerembryonen für derartige Experimente aufgrund praktisch-technischer Limitationen nicht besonders geeignet

(Schulte et al. 2007). Eine verlässliche Manipulation der Rechts/Links-Körperachse ist bei Hühnern derzeit nur *in vitro* möglich, jedoch erreichen derartig manipulierte Embryonen nicht das Alter, in dem der ausgereifte morphologische Phänotyp des PE analysiert werden kann. Mit *Xenopus* steht nun ein Modellorganismus zur Verfügung, der diese Limitationen nicht aufweist. Bei *Xenopus*embryonen konnte die Expression der linksseitigen Markergene *Nodal* und *Pitx2c* durch die Applikation verschiedener Pharmaka randomisiert werden (Levin et al. 2002; Fukumoto et al. 2005; Adams et al. 2006). Das heißt, dass neben Embryonen mit einer unilateral linksseitigen („solitus“) Expression auch Embryonen mit unilateral rechtsseitiger („inversus“), bilateraler („Linksisomerie“) oder bilateral fehlender („Rechtsisomerie“) Expression der linksseitigen Markergene gefunden wurden. Diese abweichenden Expressionsmuster linksseitiger Gene resultierten in der Bildung von Situsanomalien wie Situs inversus oder Heterotaxie (Fukumoto et al. 2005; Adams et al. 2006).

Um zu testen, ob die PE-Entwicklung bei *Xenopus* durch die bekannten Rechts/Links-Signale gesteuert wird, könnte man die Rechts/Links-Achsenspezifizierung von *Xenopus*embryonen z.B. mit Hilfe von Pharmaka stören. Sollte die PE-Entwicklung durch Rechts/Links-Signale gesteuert werden, dann wäre im Falle eines rechtsseitigen Isomerismus eine paarige, bilateral symmetrische Ausbildung des PE zu erwarten, d.h. es müssten sich sowohl ein rechtes als auch ein linkes PE bilden und mit dem Herz verwachsen. Im Falle eines linksseitigen Isomerismus wäre zu erwarten, dass sich kein PE bildet.

4.2 Lageentwicklung des MPV

Bei allen höheren Wirbeltieren erfolgt die Entwicklung des herznahen Abschnittes der pulmonal-venösen Strombahn normalerweise nach einem bilateral asymmetrischen Muster, bei dem der gemeinsame Lungenvenenstamm von den systemischen Venen getrennt und lediglich an den linken Vorhof angeschlossen wird. Obgleich ein normaler Ablauf dieses Geschehens für spätere Lebensabschnitte von vitaler Bedeutung ist, blieben verschiedene Aspekte dieses Geschehens bisher ungeklärt. Dies sind u.a.: (1) Die primäre Lagebeziehung des MPV zum Sinus venosus und zum primitiven Vorhof; (2) Die primäre Lagebeziehung des MPV zur Rechts/Links-Körperachse; und (3) Eine mögliche Paarigkeit der MPV Anlage.

4.2.1 Lagebeziehung des MPV zum Sinus venosus und zum primitiven Vorhof

Bis heute ist strittig, ob der Lungenvenenstamm anfangs gemeinsam mit den Stämmen der systemischen Venen in den Sinus venosus mündet und erst später getrennt von ihnen in den linken Vorhof einbezogen wird (Fedorow 1910; Brown 1913; Buell 1922; Rosenquist 1971; Kutsche und van Mierop 1988; De Ruiten et al. 1995; Tasaka et al. 1996; Blom et al. 2001) oder ob der Lungenvenenstamm bereits von Anfang an getrennt von den systemischen Venen in das primitive Atrium mündet (Born 1889; Neill 1956; Van Praagh und Corsini 1969; Goor und Lillehei 1975; Los 1978; Webb et al. 1998, 2000, 2001; Soufan et al. 2004; Anderson et al. 2006).

Die vorliegenden rasterelektronenmikroskopischen Befunde zeigen, dass der MPV bei *Xenopus laevis* von seinem Erscheinen im Stadium 41 an oberhalb (kranial) einer zirkulären Gewebeleiste liegt, die zwischen dem primitiven Atrium und dem Sinus venosus verläuft (Abb. 12, 14). Diese Gewebeleiste stellt eine eindeutig zu identifizierende morphologische Grenze zwischen dem primitiven Atrium und dem Sinus venosus dar und wird von mir daher als *sinu-atriale Grenzleiste* bezeichnet. Aus der Tatsache, dass der MPV bei *Xenopus laevis* von Anfang an kranial der *sinu-atrialen Grenzleiste* liegt, folgere ich, dass der Anschluss des Pulmonalvenenstammes bei dieser Art primär an das primitive Atrium erfolgt.

Angesichts dieses Befundes stellt sich die Frage, warum der MPV bei vielen anderen Wirbeltierarten primär im Sinus venosus gesehen wird. Ein Grund hierfür könnten artspezifische Entwicklungsunterschiede sein. Dem kann jedoch entgegnet werden, dass in der Literatur selbst für ein und dieselbe Art, -- z.B. das Haushuhn und die Maus --, unterschiedliche Angaben zur primären Lage des MPV gemacht werden (Fedorow 1910; Rosenquist 1971; Dor et al. 1987; De Ruiten et al. 1995; Tasaka et al. 1996; Webb et al. 1998, 2000; Männer und Merkel 2007). Ein weiterer Grund für unterschiedliche Angaben zur primären Lage des MPV könnte in der Aussagekraft der jeweils angewendeten mikroskopischen Untersuchungstechniken liegen. So stützen sich viele frühere Aussagen zur primären Lage des MPV auf die Beurteilung von zweidimensionalen histologischen Horizontalschnitten (Fedorow 1910; Kutsche und van Mierop 1988) und nicht, wie in der vorliegenden Studie, auf die Beurteilung der dreidimensionalen Verhältnisse. Während sich der Verlauf der *sinu-atrialen Grenzleiste* am

drei-dimensionalen Präparat relativ einfach verfolgen lässt (Abb. 12, 16), ist dies an histologischen Horizontalschnittserien nur unter höchsten Anforderungen an das räumliche Vorstellungsvermögen möglich. Das liegt daran, dass die Ebene der sinu-atrialen Grenzleiste gegenüber der horizontalen Körperebene von Xenopusembryonen eine deutliche dorso-kaudale Neigung aufweist (Abb. 13). In Folge der Neigung der sinu-atrialen Grenzleiste wird in Horizontalschnitten auf Höhe des MPV ventral der Sinus venosus und dorsal der primitive Vorhof angeschnitten. Wenn man diese Verhältnisse nicht beachtet, dann scheint der MPV in der dorsalen Wand des Sinus venosus zu liegen. Es ist vorstellbar, dass ähnliche Verhältnisse auch bei Embryonen anderer Lungen atmender Wirbeltieren zu finden sind und dass Beurteilungen der gestaltlichen Verhältnisse anhand von histologischen Horizontalschnitten zu einer fehlerhaften Zuordnung des MPV zum Sinus venosus geführt haben.

4.2.2 Lagebeziehung des MPV zur Rechts/Links-Körperachse

Während der MPV von einigen Autoren als ein bereits von Anfang an links gelegenes Gebilde beschrieben wird (Born 1889; Neill 1956; Goor und Lillehei 1975; Los 1978; Tasaka et al. 1996), beschreiben andere Autoren den MPV als ein ursprünglich in der Mittellinie gelegenes Gebilde, das erst durch die Bildung des Septum primum in den linken Vorhof einbezogen wird (Brown 1913; Auër 1948; Van Praagh und Corsini 1969; Webb et al. 1998; Wessels et al. 2000; Jongbloed et al. 2004).

Die vorliegenden rasterelektronenmikroskopischen Befunde zeigen, dass der MPV bei Xenopusembryonen bereits von seinem Erscheinen im Stadium 41 an links der embryonalen Körpermittellinie und dem späteren Septum interatriale im zukünftigen linken Vorhof liegt (Abb. 14). Auch hier ist festzustellen, dass eine klare Zuordnung zur linken Körperhälfte nur an drei-dimensionalen Präparaten möglich war, während dies anhand von Schnittserien zwei-dimensionaler histologischer Präparate nicht eindeutig geklärt werden konnte. Die Uneindeutigkeit histologischer Daten lässt sich durch den Umstand erklären, dass der MPV bei Xenopusembryonen ein relativ kleines Gebilde ist, das unmittelbar an die Körpermittellinie grenzt. Die geringe Größe und die unmittelbare Nähe zur Körpermittellinie können dazu führen, dass bereits relativ geringe Abweichungen zwischen realen und idealen Schnittebenen (frontal, horizontal, sagittal) zu einer Verfälschung der im histologischen Schnitt vorliegenden Lagebeziehungen

führen. So erschien der MPV in einigen Schnittserien als ein Mittelliniengebilde, während er in anderen Schnittserien als ein eindeutig links von der Mittellinie gelegenes Gebilde imponierte. Es ist vorstellbar, dass ähnliche Probleme zwei-dimensionaler Schnittbildanatomie zu den o.g. Differenzen geführt haben.

4.2.3 Unpaarigkeit versus Paarigkeit der MPV-Anlage

In der Vergangenheit haben die meisten Autoren den MPV als ein Gebilde beschrieben, das aus einer unpaaren in der Körpermittellinie gelegenen Anlage hervorgeht (Brown 1913; Auër 1948; Van Praagh und Corsini 1969; Webb et al. 1998; Wessels et al. 2000; Jongbloed et al. 2004). Diese Vorstellung hat Eingang in gängige Lehrbücher gefunden. Daneben gibt es jedoch auch einige bisher wenig beachtete Untersuchungen an Reptilien und Vögeln die zeigen, dass sich der MPV aus der linken Hälfte eines bilateral paarigen Anlagenareals, -- der sog. Pulmonalvenengrube -- , entwickelt, dessen rechte Hälfte/Anlage sich normalerweise frühzeitig zurückbildet (Fedorow 1910; Buell 1922; Dor et al. 1987; Kutsche und Van Mierop 1988; Männer und Merkel 2007). Für das mechanistische Verständnis der bilateral asymmetrischen Entwicklung der pulmonalvenösen Strombahn ist es entscheidend zu wissen, ob für den MPV eine unpaare Anlage in der Körpermittellinie oder bilateral paarige Anlagen gebildet werden. Im ersten Fall kann der unilaterale Anschluss der Lungenvenen an den linken Vorhof nur mit Septenbildungen und räumlichen Verlagerungen des MPV erklärt werden, während er im zweiten Fall relativ einfach mit der asymmetrischen Entwicklung paariger MPV Anlagen erklärt werden kann. Die bei Xenopusembryonen zu beobachtende primär linksseitige Lage des MPV (siehe oben) lässt vermuten, dass sich der MPV aus der linken Hälfte/Anlage eines primär paarigen Anlagenareals entwickeln könnte. Im Gegensatz zu den o.g. Beobachtungen bei Reptilien und Vögeln konnte ich bei Xenopusembryonen jedoch zu keinem Entwicklungszeitpunkt eine morphologisch erkennbare rechtsseitige MPV-Anlage finden. Aufgrund rein morphologischer Befunde ließ sich daher nicht ausschließen, dass sich der MPV aus einer morphologisch nicht erkennbaren Mittellinienanlage entwickelt, die bereits vor dem Erscheinen der Gefäßmündung nach links verlagert wird. Um die seiten-spezifische Herkunft des linksseitigen MPV zu klären, wurde ein „Cell Lineage Tracing“ mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Daten zeigen, dass der MPV beim Xenopusembryo von der linken Körperhälfte stammt (Abb. 15). Hinsichtlich einer

möglichen Paarigkeit ähnelt die für den MPV vorgefundene Situation somit derjenigen, die ich beim PE gefunden habe (siehe oben). Eine Klärung der Situation wäre von Expressionsanalysen von MPV spezifischen Markern zu erwarten. Aufgrund des derzeitigen Fehlens von derartigen Markern bleibt offen, ob das Anlagenareal des MPV bei Xenopusembryonen als ein primär paarig angelegtes Gebilde angesehen werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der MPV bei Xenopusembryonen bereits bei seinem Erscheinen im Stadium 41 im zukünftigen linken Vorhof liegt und von der linken Körperhälfte abstammt. Die Existenz einer morphologisch erkennbaren rechten MPV Anlage konnte nicht nachgewiesen werden. Es bleibt somit offen, ob das Anlagenareal des MPV als ein primär paarig angelegtes Gebilde angesehen werden kann.

4.2.4 Ausblick

Die Entwicklung des herznahen Abschnittes der pulmonal-venösen Strombahn erfolgt normalerweise nach einem bilateral asymmetrischen Muster. Aufgrund dieser Tatsache und aufgrund der Tatsache, dass Lungenvenenfehlbildungen häufig mit angeborenen Anomalien des Organsitus, -- insbesondere mit Isomerien --, assoziiert sind (Bartram et al. 2005; Smith et al. 2006) ist zu vermuten, dass die Lageentwicklung des MPV durch die bekannten Rechts/Links- Signale gesteuert wird. Obwohl diese Vermutung durch Befunde an *Pitx2*-Knock-out-Mäusen weiter untermauert wird (Liu et al. 2002) konnte bisher nicht genau geklärt werden wie die Umsetzung der molekularen Rechts/Links-Information in die gestaltlichen Rechts/Links-Asymmetrien der pulmonal-venösen Strombahn erfolgt. Mit *Xenopus* steht ein Modellorganismus zur Verfügung, bei dem sich die Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse relativ einfach stören lässt (siehe oben). Durch experimentelle Studien an Xenopusembryonen ließen sich evtl. neue Einsichten in die Steuerung der Entwicklung des herznahen Abschnittes der pulmonal-venösen Strombahn gewinnen. Bisher fehlten morphologische Daten zur Lageentwicklung des MPV bei *Xenopus*. Die vorliegende Studie schließt diese Datenlücke und schafft somit eine Grundlage für zukünftige experimentelle Studien.

5.0 Zusammenfassung

Fragestellung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um zwei Aspekte der Herzentwicklung beim südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) zu klären, von denen vermutet wird, dass ihre Entwicklung von Rechts/Links-Signalen gesteuert wird. Diese Aspekte sind:

- A) Die Lageentwicklung des Proepikards (PE). Hierbei handelt es sich um die Vorläuferzellpopulation für das Epikard, das kardiale Interstitium und die Kornargefäße.
- B) Die Lageentwicklung des Mündungsabschnittes des Pulmonalvenenstammes (MPV).

Speziell ging es um die Beantwortung folgender Fragen:

1. Entwickelt sich das PE, wie bei Maus und Mensch, nach einem bilateral symmetrischen Muster oder, wie beim Huhn, nach einem bilateral asymmetrischen (rechtsseitigen) Muster aus primär paarigen Anlagen?
2. Liegt der MPV ursprünglich in der dorsalen Wand des Sinus venosus oder in der dorsalen Wand des primitiven Vorhofes?
3. Liegt der MPV ursprünglich in der Mitte oder in der linken Hälfte des Sinus venosus / primitiven Vorhofes?
4. Gibt es Hinweise darauf, dass für den MPV primär paarige Anlagen, d.h. eine linksseitige und eine rechtsseitige Anlage, gebildet werden, von denen normalerweise nur die linksseitige den MPV bildet?

Material und Methoden

Zur Klärung der o.g. Fragen wurden Xenopusembryonen in den Stadien 37 bis 46 nach Nieuwkoop und Faber (1967) mittels Rasterelektronenmikroskopie und histologischer Schnittserien untersucht. Zusätzlich wurde ein „Cell Lineage Tracing“ der rechten und linken Blastomere mittels Dextran-konjugierter Fluoreszenzfarbstoffe (Alexa Fluor 647, Oregon Green 488) bis zu den Stadien 41 bis 46 durchgeführt und mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ausgewertet.

Befunde

A) Lageentwicklung des PE: Das PE bildet sich im frühen Stadium 41 als zapfenförmige Ansammlung von Mesothelzellen an der ventralen Wand des rechten Sinushorns. Im Bereich des linken Sinushorns wurde zu keinem Entwicklungszeitpunkt ein linksseitiges PE gefunden. Das rechtsseitige PE wächst nach kranial und bekommt Kontakt mit dem rechten Umfang der Kammerschleife (spätes Stadium 41). Es entsteht eine strangförmige Gewebebrücke, welche die Perikardhöhle zwischen dem rechten Sinushorn und der Kammerschleife überbrückt. Von dieser PE-Brücke ausgehend breiten sich PE-Zellen über die myokardiale Oberfläche des Herzens aus und bilden zunächst das primitive Epikard. Die PE-Brücke lässt sich bis zum Stadium 46 als eigenständiges Herzband nachweisen und kann aufgrund der Transparenz der vorderen Körperwand auch am intakten lebenden Embryo bis zum Stadium 46 identifiziert werden. Das „Cell Lineage Tracing“ bestätigte, dass das PE ausschließlich von der rechten Blastomere/Körperhälfte stammt.

B) Lageentwicklung des MPV: Der MPV erscheint im Laufe des Stadiums 41/42 als schlitzförmige Gefäßöffnung an der dorsalen Wand der Einstrombahn des embryonalen Herzens. Vom Zeitpunkt seines ersten Erscheinens an findet sich der MPV kranial einer zirkulären Gewebeleiste, die das primitive Atrium vom Sinus venosus abgrenzt. Der MPV liegt somit von Anfang an im Bereich der dorsalen Wand des primitiven Atriums. Weiterhin liegt der MPV von Anfang an links von der Körpermittellinie und links von der Anlage des Septum interatriale. Morphologische Hinweise auf die Existenz einer rechten MPV-Anlage wurden zu keinem Entwicklungszeitpunkt gefunden. Das „Cell

Lineage Tracing“ zeigte, dass der MPV von der linken Blastomere/Körperhälfte stammt.

Schlussfolgerungen

A) Bei Xenopusembryonen läuft die Lageentwicklung des PE nach einem bilateral asymmetrischen Muster ab, bei dem das definitive PE lediglich aus einer rechtsseitigen PE-Anlage gebildet wird. Die PE-Entwicklung von Xenopusembryonen gleicht somit derjenigen von Hühnerembryonen. Im Unterschied zu Hühnerembryonen kommt es allerdings nicht zur Ausbildung einer morphologisch identifizierbaren rudimentären linken PE-Anlage. Die Tatsache, dass sich bei allen bisher untersuchten Wirbeltierspezies paarige PE-Anlagen finden, lässt vermuten, dass es bei Xenopus eine linksseitige PE-Anlage geben könnte, deren Entwicklung noch vor Ausbildung eines morphologischen Phänotyps stoppt.

B) Bei Xenopusembryonen geht der MPV aus der linken Körperhälfte hervor und liegt bereits von Anfang an im späteren linken Vorhof. Da zu keinem Entwicklungszeitpunkt eine morphologisch erkennbare rechte MPV-Anlage gefunden wurde, kann eine mögliche Paarigkeit der MPV-Anlage weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Ausblick

Xenopus ist ein Modellorganismus, bei dem sich die Spezifizierung der Rechts/Links-Körperachse relativ einfach stören lässt. Durch experimentelle Studien an Xenopusembryonen ließen sich evtl. neue Einsichten in die Steuerung der Entwicklung des PE und des herznahen Abschnittes der pulmonal-venösen Strombahn gewinnen. Bisher fehlten morphologische Daten zur Lageentwicklung des PE und des MPV bei Xenopus. Die vorliegende Studie schließt diese Datenlücke und schafft somit eine Grundlage für zukünftige experimentelle Studien.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Adams DS, Robinson KR, Fukumoto T, Yuan S, Albertson RC, Yelick P, Kuo L, McSweeney M, Levin M (2006): Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* 133:1657-1671.
2. Anderson RH, Brown NA, Moorman AFM (2006): Development and structures of the venous pole of the heart. *Dev Dyn* 235:2-9.
3. Asami I: Development of the outflow tract of the rat embryonic heart. 5th European Congress, *Argumenta Communicationum (Abstract book)*; Prague 1979.
4. Auër J (1948): The development of the human pulmonary veins and its major variations. *Anat Rec* 101:581-594.
5. Bartram U, Wirbelauer J, Speer CP (2005): Heterotaxy syndrome – asplenia and polysplenia as indicators of visceral malposition and complex congenital heart disease. *Biol Neonate* 88:278-290.
6. Blom NA, Gittenberger-de Groot AC, Jongneel TH, De Ruyter MC, Poelmann RE, Ottenkamp J (2001): Normal development of the pulmonary veins in human embryos and formulation of a morphogenetic concept for sinus venosus defects. *Am J Cardiol* 87:305-309.
7. Born G (1889): Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Säugethierherzens. *Arch Mikros Anat* 33:284-378.
8. Brown AJ (1913): The development of the pulmonary vein in the domestic cat. *Anat Rec* 7:299-328.

9. Buell CE Jr (1922): Origin of the pulmonary vessels in the chick. *Contrib Embryol Carnegie Inst Wash* 14:11-26.
10. Carmona R, González-Iriarte M, Pérez-Pomares JM, Muñoz-Chápuli R (2001): Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res.* 303:173-186.
11. Carroll TJ, Vize PD (1996): Wilms' tumor suppressor gene is involved in the development of disparate kidney forms: evidence from expression in the *Xenopus* pronephros. *Dev Dyn* 206:131-138.
12. Davis CL (1924): The cardiac jelly of the chick embryo. *Anat Rec* 27:201-202.
13. DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot ACG, Wenink ACG, Poelmann RE, Mentink MMT (1995): In normal development pulmonary veins are connected to the sinus venosus segment in the left atrium. *Anat Rec* 243:84-92.
14. Dettman RW, Denetclaw W Jr, Ordahl CP, Bristow J (1998): Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 193:169-181.
15. Dor X, Corone P, Jonhson E (1987): Origin of the common pulmonary vein, septation of the primary sinus venosus atrial situs and theory of the "sinus man". *Arch Mal Coeur Vaiss* 80:483-498. (French).
16. Fedorow V (1910): Über die Entwicklung der Lungenvene. *Anat Hefte* 40:529-607.
17. Fransen ME, Lemanski LF (1990): Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Anat Rec* 226:228-236.
18. Fukumoto T, Kema IP, Levin M (2005): Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Curr Biol* 15:794-

803.

19. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE (1998): Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* 82:1043-1052.
20. Goor DE, Lillehei CW (1975): The embryology of the heart. In: Congenital malformations of the heart. Embryology, anatomy, and operative considerations. Goor DA, Lillehei CW. (eds.); Grune & Stratton, New York San Francisco London, 1975, 380-413.
21. Guioli S, Lovell-Badge R (2007): PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development* 134:4199-4208.
22. Haenig B, Kispert A (2004): Analysis of Tbx18 expression in chick embryos. *Dev Genes Evol* 214:407-411.
23. Halpern MH, May MM (1958): Phylogenetic study of the extracardiac arteries to the heart. *Am J Anat* 102:469-480.
24. Hidai H, Bardales R, Goodwin R, Quertermous T, Quertermous EE (1998): Cloning of capsulin, a basic helix-loop-helix factor expressed in progenitor cells of the pericardium and the coronary arteries. *Mech Dev* 73:33-43.
25. Hirakow R (1992): Epicardial formation in staged human embryos. *Kaibogaku Zasshi* 67:616-622.
26. Hiruma T, Hirakow R (1989): Epicardial formation in embryonic chick heart: computer-aided reconstruction, scanning, and transmission electron microscopic studies. *Am J Anat* 184:129-138.
27. Ho E, Shimada Y (1978): Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 66:579-585.

28. Ho SY, Seo JW, Brown NA, Cook AC, Fagg NLK, Anderson RH (1995): Morphology of the sinus node in human and mouse hearts with isomerism of the atrial appendages. *Br Heart J* 74:437-442.
29. Hochstetter F (1906): Beiträge zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte des Blutgefäßsystems der Krokodile. In: Voeltzkow A. (ed): Reise in Ostafrika. Wissenschaftliche Ergebnisse. *Anat Entwicklungsgesch* 4:1-133.
30. Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna RA, Morohashi K et al. (2008): Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development* 135:677-685.
31. Jacobs JP, Anderson RH, Weinberg PM, Walters HL 3rd, Tchervenkov CI, Del Duca D, Franklin RC, Aiello VD, Béland MJ, Colan SD et al. (2007): The nomenclature, definition and classification of cardiac structures in the setting of heterotaxy. *Cardiol Young* 17 (Suppl 2):1-28. Review.
32. Jongbloed MRM, Schalij MJ, Poelmann RE, Blom NA, Fekkes ML, Wang Z, Fishman GI, Gittenberger-de Groot AC (2004): Embryonic conduction tissue: a spatial correlation with adult arrhythmogenic areas. *J Cardiovasc Elektrophysiol* 15:349-355.
33. Klein SL (1987): The first cleavage furrow demarcates the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 120:299-304.
34. Komiyama M, Ito K, Shimada Y (1987): Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol* 176:183-189.
35. Kraus F, Haenig B, Kispert A (2001): Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx 18*. *Mech Dev* 100:83-86.
36. Kuhn HJ, Liebherr G (1988): The early development of the epicardium in *Tupaia belangerie*. *Anat Embryol* 177:225-234.

37. Kurkiewicz T (1909): O histogenezie miesna sercowego zwierzat kregowych - Zur Histogenese des Herzmuskels der Wirbeltiere. Bull Int Acad Sci Cracovie 148-191.
38. Kutsche LM, Van Mierop LH (1988): Development of the pulmonary vein in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Anat Rec 222:170-176.
39. Landerholm TE, Dong XR, Lu J, Belaguli NS, Schwartz RJ, Majesky MW (1999): A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. Development 126:2053-2062.
40. Levin M (2006): Is the early left-right axis like a plant, a kidney, or a neuron? The integration of physiological signals in embryonic asymmetry. Birth Defects Res C Embryo Today 78:191-223. Review.
41. Levin M, Mercola M (1998): The compulsion of chirality: toward an understanding of left-right asymmetry. Genes Dev 12:763-769. Review.
42. Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, Mercola M (2002): Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. Cell 111:77-89.
43. Liu C, Liu W, Palie J, Lu MF, Brown NA, Martin JF (2002): Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions. Development 129:5081-5091.
44. Lohr JL, Yost HJ (2000): Vertebrate model systems in the study of early heart development: *Xenopus* and zebrafish. Am J Med Genet 97:248-257.
45. Los JA (1978): Cardiac septation and development of the aorta, pulmonary trunk, and pulmonary veins: previous work in the light of recent observations. Birth Defects 14:109-138.
46. Männer J (1992): The development of pericardial villi in the chick embryo. Anat

Embryol 186:379-385.

47. 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* 255:212-226.
48. Männer J (2006): Extracardiac tissues and the epigenetic control of myocardial development in vertebrate embryos. *Ann Anat* 188:199-212.
49. Männer J, Merkel N (2007): Early morphogenesis of the sinuatrial region of the chick heart: a contribution to the understanding of the pathogenesis of direct pulmonary venous connections to the right atrium and atrial septal defects in hearts with right isomerism of the atrial appendages. *Anat Rec (Hoboken)* 290:168-180.
50. Männer J, Seidl W, Steding G (1996): Experimental study on the significance of abnormal cardiac looping for the development of cardiovascular anomalies in neural crest-ablated chick embryos. *Anat Embryol* 194:289-300.
51. Männer J, Pérez-Pomares JM, Macias D, Muñoz-Chápuli R (2001): The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 169:89-103.
52. Masho R (1990): Close correlation between the cleavage plane and the body axis in early *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ* 32:57-64.
53. Mikawa T, Fishman DA (1992): Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9504-9508.
54. Mikawa T, Gourdie RG (1996): Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 174:221-232.

55. Mittwoch U (1998): Phenotypic manifestations during development of the dominant and default gonads in mammals and birds. *J Exp Zool* 281:466-471.
56. Mollier S: Die erste Anlage des Herzens bei den Wirbeltieren. In: Hertwig, O. (ed): *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere*. Gustav Fischer, Jena 1906, Band 1 Teil 1 1026-1051.
57. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A (1999): YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126:1845-1857.
58. Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, Fernández B, Sans-Coma V (1997): Development of the epicardium in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Acta Zool (Stockholm)* 78:39-46.
59. Neill CA (1956): Development of the pulmonary veins with reference to the embryology of anomalies of pulmonary venous return. *Pediatrics* 18:880-887.
60. Nieuwkoop PD, Faber J (1967): *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam: North-Holland.
61. Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Muñoz-Chápuli R (2002): Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* 46:1005-1013.
62. Pombal MA, Carmona R, Megias M, Ruiz A, Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R (2008): Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from annchestral pronephric external glomerulus. *Evol Dev* 10:210-216.
63. Ramsdell AF, Bernanke JM, Johnson J, Trusk TC (2005): Left-right lineage analysis of the av cushion tissue in normal and laterality defective *Xenopus* hearts. *Anat Rec Part A* 287A:1176-1182.

64. Robb L, Mifsud L, Hartley L, Biben C, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Harvey RP (1998): Epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. *Dev Dyn* 213:105-113.
65. Rosenquist GC (1971): Pulmonary veins in the chick embryo: origin as determined by radioautographic mapping. *Anat Rec* 169:65-69.
66. Sadler TW: *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. 11. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2008.
67. Schlueter J, Brand T (2009): A right-sided pathway involving FGF8/Snai1 controls asymmetric development of the proepicardium in the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7485-7490.
68. Schlueter J, Männer J, Brand T (2006): BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Dev Biol* 295:546-558.
69. Schulte I, Schlueter J, Abu-Issa R, Brand T, Männer J (2007): Morphological and molecular left-right asymmetries in the development of the proepicardium: a comparative analysis on mouse and chick embryos. *Dev Dyn* 236:684-695.
70. Serluca FC (2008): Development of the proepicardial organ in the zebrafish. *Dev Biol* 315:18-27.
71. Simrick S, Masse K, Jones EA (2005): Developmental expression of Pod 1 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 49:59-63.
72. Smith A, Ho SY, Anderson RH, Connell MG, Arnold R, Wilkinson JL, Cook AC (2006): The diverse cardiac morphology seen in hearts with isomerism of the atrial appendages with reference to the disposition of the specialised conduction system. *Cardiol Young* 16:437-454.
73. Soufan AT, van den Hoff MJB, Ruijter JM, de Boer PAJ, Hagoort J, Webb S, Anderson RH, Moorman AFM (2004): Reconstruction of the patterns of gene

- expression in the developing mouse heart reveals an architectural arrangement that facilitates the understanding of atrial malformations and arrhythmias. *Circ Res* 95:1207-1215.
74. Tasaka H, Krug EL, Markwald RR (1996): Origin of the pulmonary venous orifice in the mouse and its relationship to the morphogenesis of the sinus venosus, extracardiac mesenchyme (spina vestibuli) and atrium. *Anat Rec* 246:107-113.
75. Van Praagh R, Corsini I (1969): Cor triatriatum: Pathologic anatomy and a consideration of morphogenesis based on 13 postmortem cases and a study of normal development of the pulmonary vein and atrial septum in 83 human embryos. *Am Heart J* 78:379-405.
76. Virágh S, Challice CE (1981): The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 201:157-168.
77. Virágh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kálmán F (1993): Early development of the quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol* 188:381-393.
78. Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM (2003): Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. *Circ Res* 92:525-531.
79. Warkman AS, Krieg PA (2007): *Xenopus* as a model system for vertebrate heart development. *Sem Cell Dev Biol* 18:46-53. Review.
80. Webb S, Brown NA, Wessels A, Anderson RH (1998): Development of the murine pulmonary vein and its relationship to the embryonic venous sinus. *Anat Rec* 250:325-334.
81. Webb S, Brown NA, Anderson RH, Richardson MK (2000): Relationship in the chick of the pulmonary vein to the embryonic systemic venous sinus. *Anat Rec*

259:67-75.

82. Webb S, Kanani M, Anderson RH, Richardson MK, Brown NA (2001): Development of the human pulmonary vein and its incorporation in the morphologically left atrium. *Cardiol Young* 11:632-642.
83. Wessels A, Anderson RH, Markwald RR, Webb S, Brown NA, Viragh S, Moorman AFM, Lamers WH (2000): Atrial development in the human heart: An immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues. *Anat Rec* 259:288-300.
84. Wilting J, Buttler K, Schulte I, Papoutsi M, Schweigerer L, Männer J (2007): The proepicardium delivers hemangioblasts but not lymphangioblasts to the developing heart. *Dev Biol* 305:451-459.
85. Wolpert L, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E, Robertson E, Smith J: *Principles of Development: Das Original mit Übersetzungshilfen*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg 2007.

Danksagung

Für die Themenstellung dieser Dissertation möchte ich Herrn PD Dr. med. Jörg Männer herzlich danken. Seine intensive und herausragende Betreuung sowie seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft verhalfen mir zur Fertigstellung der vorliegenden Dissertation.

Für die stets freundliche und kompetente Unterstützung bei der Arbeit im Labor und bei der computergestützten Bildbearbeitung danke ich besonders Herrn Hans-Georg Sydow.

Frau Kirsten Falk-Stietenroth danke ich für die Herstellung der histologischen Schnittserien und für ihre Arbeit im Photolabor.

Herrn Dr. Bernd Püschel danke ich für seine Hilfe bei den Untersuchungen mit dem Laser Scanning Mikroskop.

Mein Dank richtet sich auch an Herrn Prof. Dr. Tomas Pieler, der mir freundlicherweise die Xenopusembryonen zur Verfügung gestellt hat und es mir ermöglichte, die Farbstoffinjektionen für das „Cell Lineage Tracing“ in seinem Labor durchzuführen. Ganz herzlich möchte ich auch Frau Dr. Katharina Damianitsch danken, die mir den Umgang mit Xenopus-embryonen erklärt und mich bei den Injektionen mit den Fluoreszenzfarbstoffen unterstützt hat.