

Aus dem Institut für Anatomie und Embryologie
(Prof. Dr. med. C. Viebahn)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Cardiac Looping und die frühe Topogenese der AV-Region:
Untersuchung an Hühnerembryonen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Thomas Reichel
aus Marienberg

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

Referent/in: PD Dr. Jörg Männer

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Theodoros Tirilomis

Drittreferent/in: PD Dr. Claudius Jacobshagen

Datum der mündlichen Prüfung: 22.08.2017

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel „ Cardiac Looping und die frühe Topogenese der AV-Region: Untersuchung an Hühnerembryonen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Embryonaler AV-Kanal und AV-Kissen	1
1.2 Klinische Bedeutung der AV-Region	5
1.3 Viszerale Rechts – Links – Asymmetrien	7
1.4 Determination der Rechts- Links-Körperachse	10
1.5 Rechts-Links-Achsendifferenzierung und Herzentwicklung.....	11
1.6 Cardiac Looping und die Lageentwicklung der Vorhöfe und des AV-Kanals.....	13
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Hühnerembryonen	16
2.2 Präparation und Fixierung	16
2.3 Dokumentation der 3D-Konfiguration des Endokardschlauches.....	17
2.3.1 Erstellung von optischen Gewebeschnittserien mittels Optischer Kohärenz Tomographie (OCT).....	17
2.3.2 Computer gestützte 3D-Rekonstruktion.....	17
3. Ergebnisse.....	19
3.1 Gestalt des endsystolischen Endokardschlauchs im HH-Stadium 11.....	19
3.2 Änderungen in der Gestalt des ventrikulären Endokardschlauches infolge eines Umbaus der Cardiac jelly.....	21
3.3 Lageänderungen des AV-Kanals während der HH-Stadien 11-18.....	25
3.3.1 „Schwenkung“ der AV-Ebene.....	25
3.3.2 Torsion im Bereich des AV-Kanals.....	26
4. Diskussion.....	29
4.1 Lageänderungen des AV-Kanals während der Herzschleifenbildung.....	29
4.2 Bedeutung für das Verständnis der normalen und gestörten Herzentwicklung.....	30
4.2.1 Normale und gestörte Septierung des AV-Kanals.....	30
5. Zusammenfassung.....	33
6. Literaturverzeichnis.....	35

1. Einleitung

1.1. Embryonaler AV-Kanal und AV-Kissen

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Aspekten der Frühentwicklung der atrioventrikulären (AV) Region des embryonalen Herzen, namentlich mit der frühen Lageentwicklung der so genannten Endokardkissen. Das embryonale Herz ist zu diesem Zeitpunkt eine schraubig gewundene „S-förmige“ klappenlose Schlauchpumpe mit einer noch ungeteilten Strombahn, die das Blut mittels peristaltischer Kontraktionen transportiert.

Beim AV-Kanal handelt es sich um das zwischen dem primitiven Vorhof und dem primitiven Ventrikel gelegene Bauelement des „S-förmigen“ embryonalen Herzschlauchs (Lamers et al. 1992; Franco et al. 2000; Kim et al. 2001; Anderson et al. 2006). Dieser lässt sich entsprechend dem Blutfluss in folgende Bauelemente unterteilen (Abb.1): (1.) den primitiven noch ungeteilten Vorhof, der das frühembryonale Herz mit dem venösen System des Embryos verbindet; (2.) den o.g. AV-Kanal; (3.) den primitiven rechten und linken Ventrikel und (4.) den Ausflusstrakt (de la Cruz et al. 1997; de la Cruz und Sanchez 1998; Franco et al. 2000; Christoffels et al. 2004; Anderson et al. 2003a, 2006). Letzterer verbindet den embryonalen rechten Ventrikel mit dem Saccus aorticus, der das Blut auf die Pharyngealbogenarterien verteilt (Anderson et al. 2003b; Rana et al. 2007; Kirby 2007).

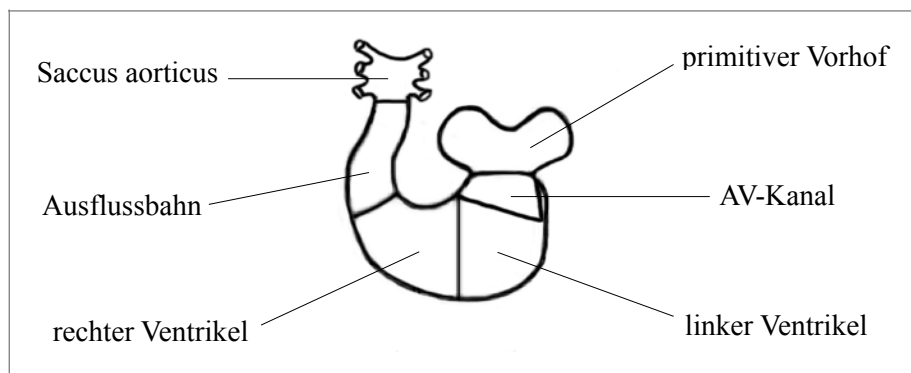


Abb. 1. S-förmiger embryonaler Herzschlauch mit seinen Bauelementen

Bei Endokardkissen handelt es sich um paarige, sich gegenüberliegende wulstförmige Verdickungen des Endokards im Bereich des AV-Kanals und des Ausflusstrakts des „S-förmigen“ embryonalen Herzschlauches. Sie bestehen aus extrazellulärer Matrix und enthalten Mesenchymzellen, die aus dem Endokard durch epithelio-mesenchymale Transition hervorgehen (Markwald et al. 1977; Bolender und Markwald 1979; Kinsella und Fitzharris 1980; Nakajima et al. 2000; Lincoln et al. 2004).

Endokardkissen erfüllen drei Aufgaben während der Herzentwicklung:

1. Zusammen mit der sie umgebenden Wandmuskulatur fungieren Endokardkissen als Sphinkteren im klappenlosen, sich peristaltisch kontrahierenden Herzschauch. Bei der Kontraktion der Muskulatur kommt es zu einer Annäherung der gegenüberliegenden Kissen und das Lumen wird verschlossen (Abb.2). Hierdurch wird ein Rückfluss von Blut in die stromaufwärts gelegenen Abschnitte verhindert (Patten et al. 1948).

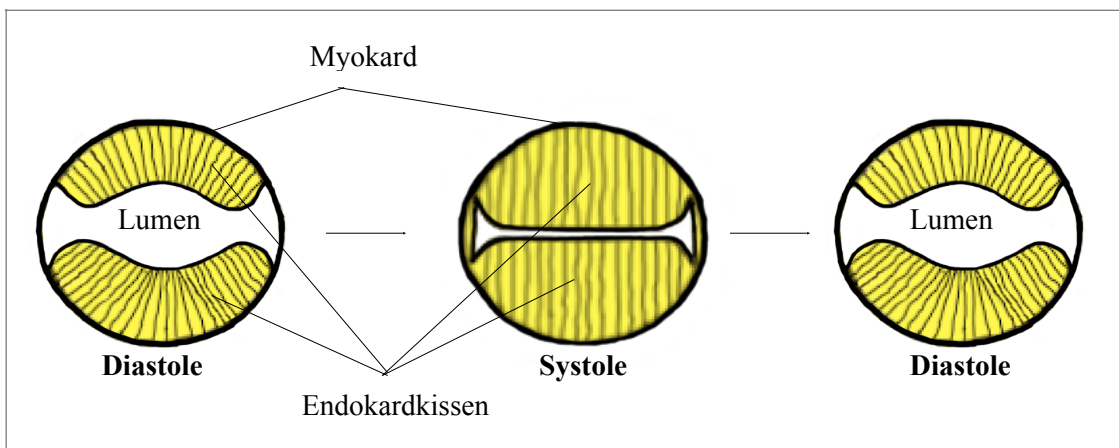


Abb. 2. Schematische Darstellung der Formänderungen des Querschnitts des AV-Kanals während des Herzzyklus: Zum Ende der Systole kommt es zu einem vollständigen Verschluss des Lumens

2. Weiterhin dienen Endokardkissen als Anlagen für die Scheidewände des späteren vierkammerigen Herzen (Van Mierop et al. 1962; Sissman 1970; de la Cruz et al. 1983; Wenink und Gittenberger-de Groot 1985; Schroeder et al. 2003; Wessels und Sedmera 2003; Kruithof et al. 2007). Anfänglich gibt es im AV-Kanal ein oberes und unteres Endokardkissen, die in der Literatur häufig auch als vorderes und hinteres Endokardkissen bezeichnet werden. Diese Endokardkissen stehen stromaufwärts mit dem Septum primum des Vorhofes und stromabwärts mit der muskulären Anlage des Kammerseptums in Verbindung (Abb.3). Nach der klassischen Lehrbuchdarstellung sorgt dieser septale Komplex für die Unterteilung des embryonalen Vorhofes und der AV-Region in eine systemische und pulmonale Strombahn (Wenink 1974; Sadler 2008). Hierbei wachsen oberes und unteres Endokardkissen aufeinander zu. Der zunächst ungeteilte AV-Kanal wird so während der Kontraktion seiner Wandmuskulatur zeitweilig in zwei getrennte Strombahnen - *Canalis atrioventricularis dexter und sinister* - unterteilt (Dalglish 1976; Igarashi 1984; Sadler 2008). Indem oberes und unteres Endokardkissen miteinander verschmelzen, werden die zunächst noch funktionell getrennten Strombahnen auch strukturell voneinander getrennt (Abb.4).

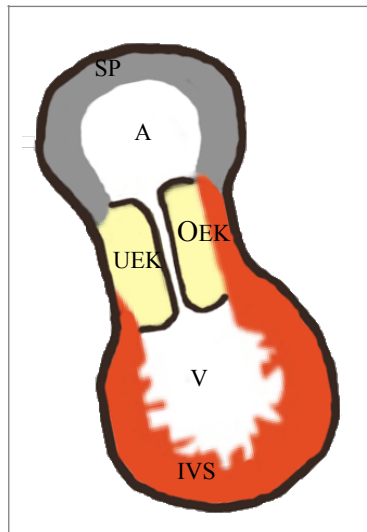


Abb. 3. Klassische Lehrbuchdarstellung des AV-Septalen Komplex (schematische Darstellung eines Sagittalschnitts im Bereich des AV-Kanals); Zusammenhang zwischen AV-Kissen, Septum primum (SP) und Anlage des Interventrikulärseptum (IVS). A = Atrium, V = Ventrikel, OEK = oberes Endokardkissen, UEK = unteres Endokardkissen

Die Unterteilung der Strombahn des Ausflusstraktes des embryonalen Herzens vollzieht sich ebenfalls durch Bildung von paarigen Längswülsten im proximalen und distalen Abschnitt der Ausflussbahn. Diese leistenförmigen Wülste entstehen ebenfalls durch proliferierende Mesenchymzellen und gleichen in Aufbau und Funktion den Endokardkissen im AV-Kanal (Rothenberg et al. 2003; Restivo et al. 2006).

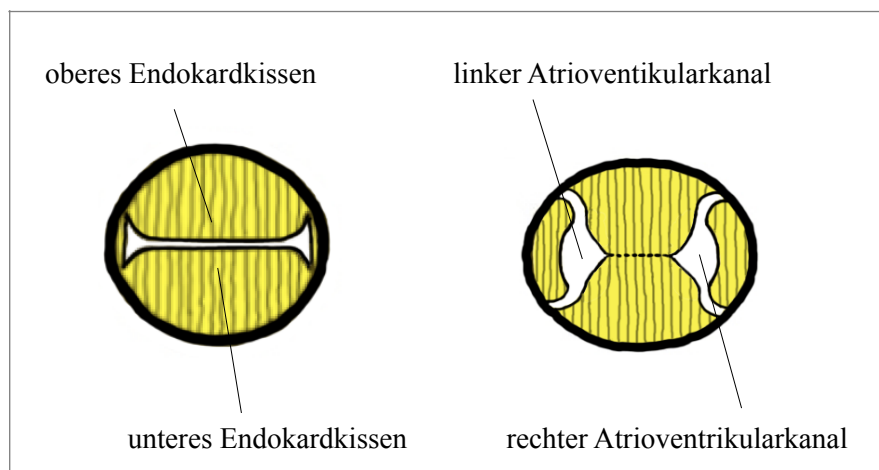


Abb. 4. Unterteilung des AV-Kanals durch Fusion der AV-Kissen (schematische Darstellung), mod. nach Sadler 2008

3. Des Weiteren liefern Endokardkissen Material für die Herzklappen im AV-Bereich und Ausflusstrakt des späteren vierkammerigen Herzens (Van Mierop et al. 1962; Sissman 1970; de la Cruz et al. 1983; Wenink und Gittenberger-de Groot 1985; Wessels et al. 1996; Schroeder et al. 2003; Wessels und Sedmera 2003; de Lange et al. 2004; Kruithof et al. 2007). Zeitlich versetzt treten neben dem oberen und unteren Endokardkissen am rechten und linken Umfang des AV-Kanals laterale Endokardkissen auf. Im AV-Kanal liefert das rechte seitliche Endokardkissen Material für des vordere und hintere Segel der Trikuspidalklappe, während das linke seitliche Kissen Material für das murale Segel der Mitralklappe liefert (Lamers et al. 1995; Lamers und Moorman 2002; Wessels und Sedmera 2003; de Lange et al. 2004; Moorman et al. 2004). Das obere Endokardkissen liefert das Material für das aortale Segel der Mitralklappe, wohingegen das untere Endokardkissen das Material für das septale Segel der Trikuspidalklappe liefert (Abb.5).

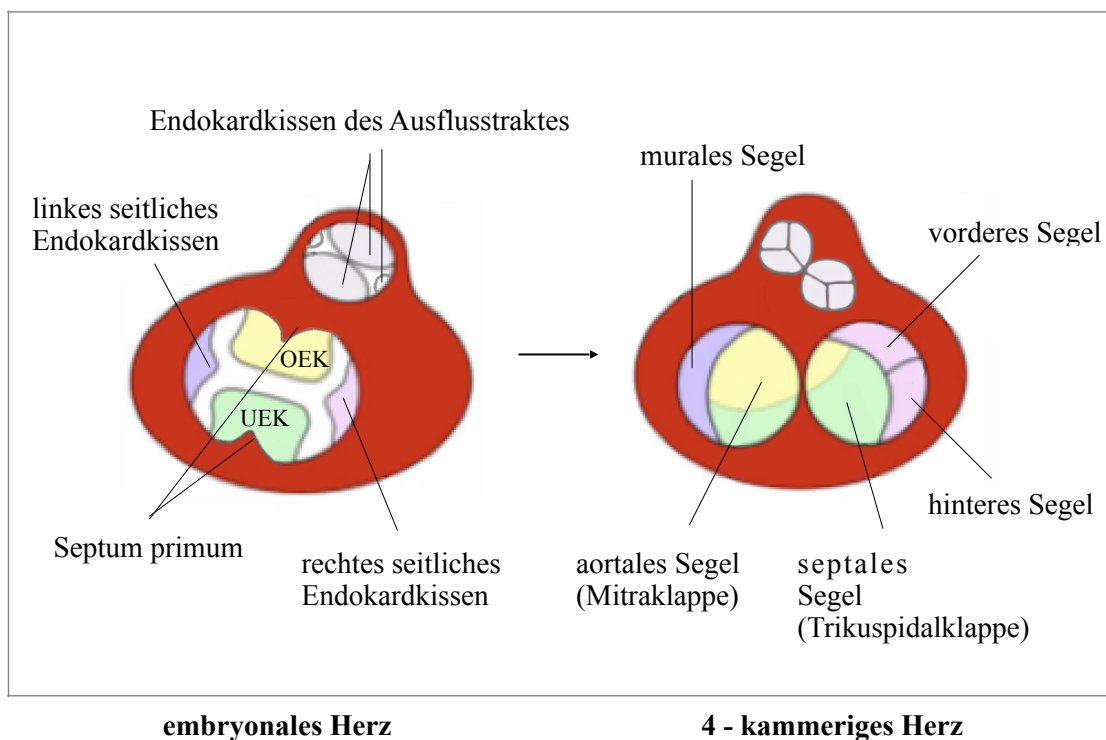


Abb. 5. Beitrag der AV-Kissen zu den Klappensegeln der Trikuspidal- u. Mitralklappe, OEK = oberes Endokardkissen, UEK = unteres Endokardkissen, (schematische Ansicht der Ventilebene; modifiziert nach Snarr et al. 2008, S. 2806)

1.2. Klinische Bedeutung der AV-Region

Angeborene Herzfehler kommen mit einer Häufigkeit von etwa 1 auf 100 Lebendgeburten vor (Ferencz et al. 1985; Hoffman et al. 1990; Pierpont et al. 2000; Hoffman und Kaplan 2002). Jährlich kommen in Deutschland ca. 5000 Kinder mit angeborenen Herzfehlern zur Welt (Kallfelz 1999). Die AV-Region ist dabei in 3-7,5% der angeborenen Herzfehler betroffen (Samanek et al. 1991; Pierpont et al. 2000).

Als Beispiel für eine Fehlbildung der AV-Region soll der persistierende AV-Kanal, auch gemeinsamer AV-Kanal genannt, beschrieben werden (Warkany et al. 1966; Rehder 1981; Marino 1993; Webb et al. 1996; Ferencz et al. 1997; Maslen 2004; Weijerman et al. 2010; Ackerman et al. 2012). Es handelt sich hierbei um einen innerhalb des Herzens gelegenen Scheidewanddefekt, der zu einer Shuntverbindung auf Vorhofs- und Kammerebene führt. Betroffene Kinder entwickeln bereits kurz nach der Geburt einen Links-Rechts-Shunt, der frühzeitig zu den Symptomen einer Rechtsherzinsuffizienz, beispielsweise zu Stauungsleber, Stauungsniere und Stauungsgastritiden führt (Kawahito et al. 2003). Aufgrund der oben beschriebenen Rolle der Endokardkissen bei der Bildung der Scheidewände der AV-Region wurden derartige AV-Septum-Defekte in der Literatur als *Endokardkissendefekte* interpretiert (Van Mierop et al. 1962; Anderson et al. 1991; Rajagopal et al. 2007).

Neuere Daten zeigen jedoch, dass der AV-Septumkomplex neben dem Mesenchym der Endokardkissen auch primär extrakardiales Mesenchym aus dem embryonalen Mediastinum enthält (Lamers und Moorman 2002; Abu-Issa und Kirby 2007; Snarr et al. 2007a, 2007b). Diese extrakardiale Quelle wurde bereits von His als *Spina vestibuli* beschrieben (His 1880) und wird in der neueren Literatur als *dorsale mesenchymale Protrusion* bezeichnet (Tasaka et al. 1996; Wessels et al. 1996, 2000). Im primitiven noch ungeteilten Vorhof stellt die dorsale mesenchymale Protrusion über das dorsale Mesokard eine Verbindung zum dorsalen Mediastinum her (Wessels et al. 1996, 2000; Kim et al. 2001; Snarr et al. 2007a, 2007b). Nach ventral besteht über das Septum primum eine Verbindung zum oberen und unteren Endokardkissen (Arrechedera et al. 1987; Wessels et al. 2000). Indem das Mesenchym der AV-Kissen mit dem Septum primum und der Dorsalen Mesenchymalen Protrusion verschmilzt kommt es zur Ausbildung des AV-Mesenchymalen Komplex, der den embryonalen Vorhof und den AV-Kanal in rechte und linke Strombahnen unterteilt (Snarr et al. 2007b) / (Abb. 6B). Man geht heute davon aus, dass dem persistierendem AV-Kanal eine komplexe Störung in der Ausbildung des AV-Mesenchymalen Komplexes zugrunde liegt, wobei Defekten der Dorsalen Mesenchymalen Protrusion eine entscheidende Rolle zukommen soll (Blom et al. 2003, Sharratt et al. 2003; Snarr et al. 2007a; Wirrig et al. 2007; Goddeeris et al. 2008).

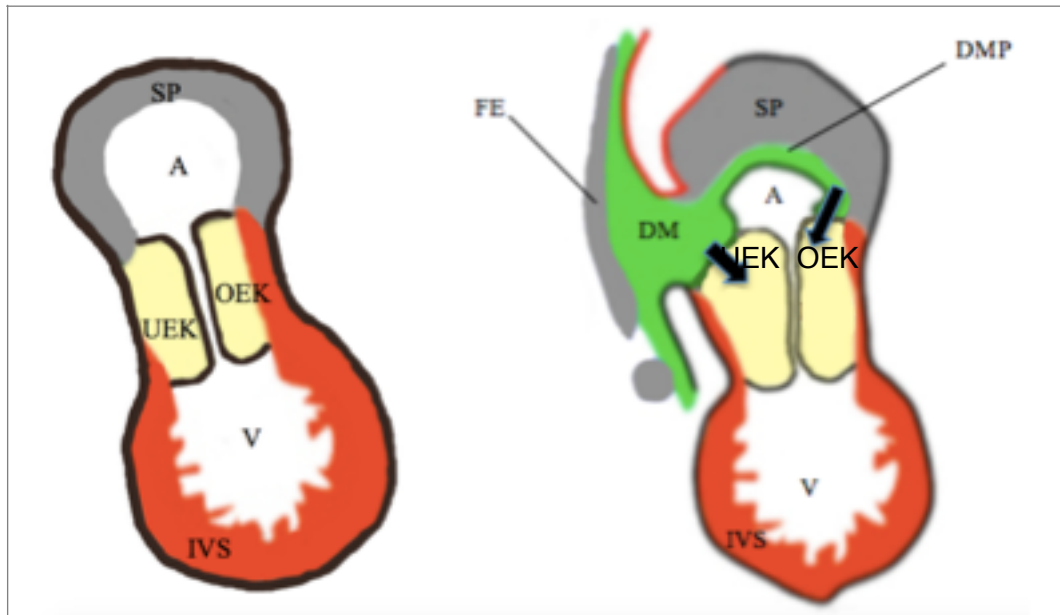


Abb. 6. Gegenüberstellung der traditionellen (A) und aktuellen Vorstellung (B) zur Zusammensetzung des AV-Septalen Komplexes. Die aktuelle Vorstellung sieht in der Dorsalen Mesenchymalen Protrusion (grün) eine wesentliche Komponente des AV-Septalen Komplexes, die in der traditionellen Vorstellung fehlt. FE = Vorderdarmendoderm, DM = Dorsales Mesokard, OEK = oberes Endokardkissen, UEK = unteres Endokardkissen, DMP = Dorsale Mesenchymale Protrusion (modifiziert nach Goddeeris et al. 2008, S. 1893)

Es stellt sich hier die Frage, welche Ursachen derartigen AV-Defekten zugrunde liegen. Antworten hierauf könnten beobachtete Häufungen von AV-Kanal-Defekten bei bestimmten Patientengruppen geben. So findet sich ein persistierender AV-Kanal bei etwa 40% der Patienten mit *Trisomie 21* (Korenberg et al. 1990, 1992). Ursächlich hierfür könnte eine Störung in der Expression von Bestandteilen der extrazellulären Matrix - beispielsweise der Kollagensynthese - während der Herzentwicklung sein, die bei menschlichen Feten mit *Trisomie 21* beobachtet wurde (Gittenberger-de Groot et al. 2003). Eine Störung in der *Kollagen VI* Synthese bedingt hierbei eine Fehlfaltung der α -Kollagenketten im AV-Bereich des embryonalen Herzen (Davies et al. 1995; Eisenberg und Markwald 1995; Oosthoek et al. 1998; Klewer et al. 1998; Baptista et al. 2000; Gittenberger-de Groot et al. 2003). Zu nennen wäre weiterhin das *Down Syndrome Critical Region 1 (DSCR1) Gen*, welches auch als *modulatorisches Calcineurin-interacting protein 1 (MCIP1)* bezeichnet wird (Korenberg et al. 1994; Fuentes et al. 1995, Ferrara et al. 2004). Es wird bei menschlichen Feten vorwiegend im Endokard der AV-Kissen und in der muskulären Anlage des Kammerseptums exprimiert (Casas et al. 2001; Vega et al. 2003). In welchem Umfang das Expressionsmuster von *DSCR1* die Kollagensynthese und damit die Entstehung von AV-Kanal-Defekten beeinflusst, ist Gegenstand aktueller Forschung und wird kontrovers diskutiert (Hesser et al. 2004; Korbel et

al. 2009). Aufgrund von Sequenzhomologien (*Syntheny*) zwischen dem murinen Chromosom 16 und dem humanen Chromosom 21 gelten *Trisomie 16-Mäuse* als Tiermodell für die humane Trisomie 21 (Hiltgen et al. 1996; Webb et al. 1996, 1997, 1999). In *Trisomie 16-Mäusen* sind Volumen und Zelldichte in den AV-Kissen verändert, wobei die molekularen Ursachen noch nicht genau verstanden sind (Pexieder et al. 1981; Epstein et al. 1985; Epstein 1985; Reeves et al. 1986; Gearhart et al. 1986; Nadeau 1989; Lyon und Kirby 1995; Webb et al. 1996). In *Trisomie 16-Mäusen* ist die Verbindung der *Dorsalen Mesenchymalen Protrusion* mit dem hinteren Endokardkissen derart gestört, dass von einer Hypoplasie der Dorsalen Mesenchymalen Protrusion ausgegangen werden kann (Webb et al. 1999; Snarr et al. 2007a).

Ein persistierender AV-Kanal findet sich weiterhin fast regelhaft, namentlich 50%, bei angeborenen Störungen der Determination der Rechts-Links-Körperachse (Van Mierop 1977; Nugent et al. 1994; Bowers et al. 1996; Harvey 1998), namentlich bei so genannten *Heterotaxien* (Lewis und Abbott 1915, 1916; van Praagh und van Praagh 1966, van Praagh 1972; Layton und Manasek 1980; Tomita et al. 1991; Icardo et al. 1995; Yasui et al. 1998, Ramsdell 2005; Levin 2005; Ramsdell 2005, Fakhroa et al. 2011). Dies lässt vermuten, dass die Determination der Rechts-Links- Körperachse eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des AV-Septalen Komplexes spielt. Der funktionelle Zusammenhang zwischen der Determination der Rechts-Links-Achse und der Entwicklung des AV-Septalen Komplexes konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten zu klären, welche Rolle die Determination der Rechts-Links-Körperachse bei der Entwicklung des AV-Bereichs und des AV-Septalen Komplexes spielt.

1.3. Viszerale Rechts – Links Asymmetrien

Abgesehen von leichten Seitenunterschieden erscheint die äußere Gestalt des Menschen und der meisten Wirbeltiere bilateral symmetrisch. Demgegenüber fällt auf, dass die inneren Organe von Wirbeltieren bezüglich Form und Lageverhältnissen in Spezies-spezifischer Weise asymmetrisch angeordnet sind. Beispielsweise zeigt die rechte Lunge des Menschen normalerweise eine Dreilappung und wird über einen kurzen, steil verlaufenden Hauptbronchus versorgt. Die linke Lunge hingegen besitzt nur zwei Lappen und wird über einen längeren und stärker zur Seite abgewinkelten Hauptbronchus versorgt.

Der normale Organsitus wird allgemein als *Situs solitus* bezeichnet. Abweichungen vom normalen Organsitus sind selten und werden mit unterschiedlicher Prävalenz in der Literatur beschrieben. Die bekannteste Form ist der *Situs inversus* mit einer Prävalenz von 1:9000, bei dem die inneren Organe spiegelbildlich zur normalen Form und Lage ausgebildet sind (Bowers et al. 1996; Bartram et al. 2001; Müller und Hassel 2012). Bezogen auf die

menschlichen Lungen wäre beim Situs inversus zu erwarten, dass die links gelegene Lunge drei Lappen aufweist, wo hingegen sich bei der rechts gelegenen Lunge nur zwei Lappen finden (Abb.7). Meist bestehen für die Betroffenen keine funktionellen Auswirkungen, so dass diese Situsvariante oftmals zufällig diagnostiziert wird. Weniger bekannt sind so genannte *Heterotaxien*, beispielsweise der *Isomerismus*. Beim Isomerismus handelt es um das Vorliegen von bilateral symmetrischen Organen in einem rechts- oder linksseitigen Muster.

Im Falle eines linksseitigen Isomerismus der Lunge finden sich zwei morphologisch linke, d.h. zweilappige Lungen, die jeweils von einem langen, zur Seite abgewinkelten Hauptbronchus versorgt werden. Beim rechtsseitigen Isomerismus der Lunge wären hingegen zwei morphologisch rechte, d.h. dreilappige Lungen zu erwarten, die jeweils beide von einem kurzen und steil verlaufenden Bronchus versorgt werden (Abb.7).

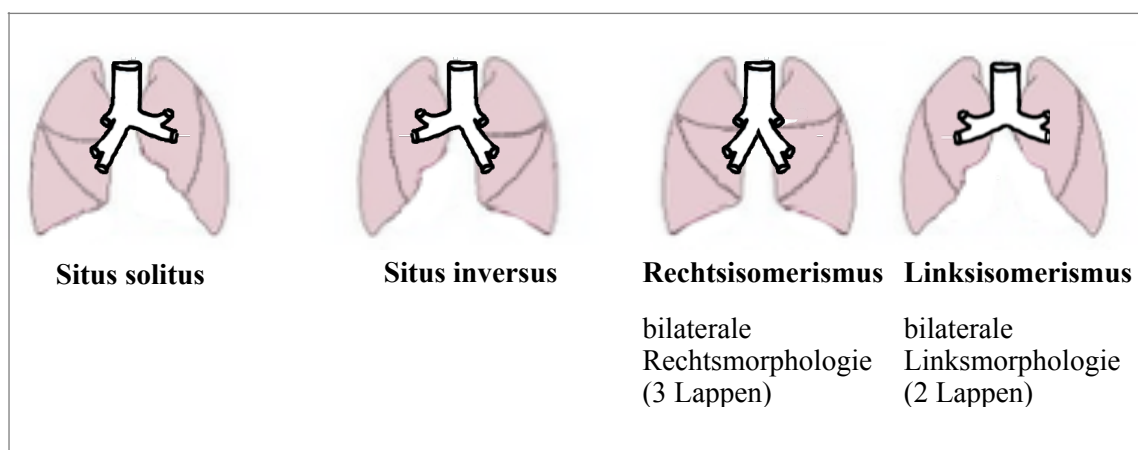


Abb.7. Situsanomalien am Beispiel der Lungen

Beim Herz zeigen sich morphologische Rechts-Links-Asymmetrien auf der Ebene der Vorhöfe. Beide Vorhöfe unterscheiden sich typischerweise in der Form ihrer Herzohren. Das rechte Herzohr ist morphologisch durch eine breitbasige pyramidenartige Form und eine weite Öffnung in den Vorhof charakterisiert; das linke Herzohr hingegen ist schmal und fingerförmig und hat nur eine enge Öffnung in den Vorhof (Abb.8). Weitere gestaltliche Merkmale, in denen sich die Vorhöfe voneinander unterscheiden, sind die Verbindungen zu den Venen des Körper- und Lungenkreislaufs. Der rechte Vorhof nimmt normalerweise die Körpervenien auf, wohingegen die Pulmonalvenen in den linken Vorhof münden.

Der Sinusknoten liegt normalerweise in der Wand des rechten Vorhofs in einer Furche zwischen der Mündung der oberen Hohlvene und dem rechten Herzohr, während der linke Vorhof normalerweise keinen Sinusknoten besitzt. Im Falle eines vollständig ausgebildeten

rechtsseitigen Isomerismus weisen beide Vorhöfe große pyramidenförmige Herzohren auf. Jeder der Vorhöfe besitzt einen Sinusknoten. Die Körpervenen wären sowohl an den rechts- als auch den links gelegenen Vorhof angeschlossen. Pulmonalvenenmündungen in die Vorhöfe würden in diesem Fall vollständig fehlen. Bei vollständig ausgeprägtem *linksseitigem Isomerismus* wäre hingegen zu erwarten, dass beide Vorhöfe schmale, fingerförmige Herzohren besitzen. Die rechten Lungenvenen würden in den rechts gelegenen Vorhof münden, die linken Lungenvenen in den links gelegenen Vorhof. Ein Sinusknoten wäre in keinem der Vorhöfe vorhanden (Abb.8).

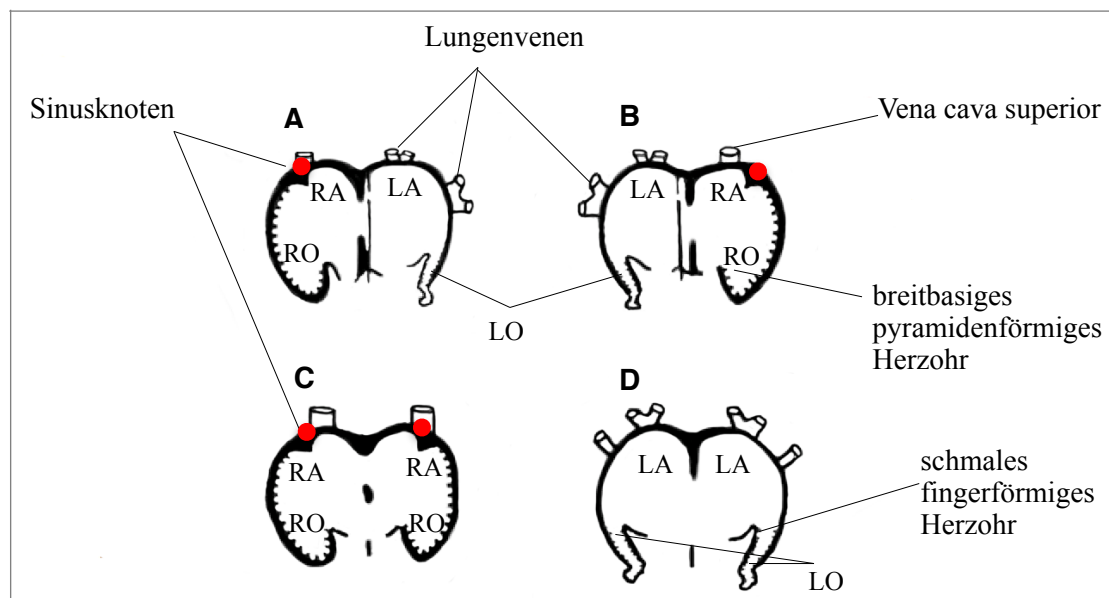


Abb. 8. Situsanaomalien am Beispiel des Herzens: RA = rechter Vorhof, LA = linker Vorhof, RO = rechtes Herzohr, LO = linkes Herzohr (modifiziert nach Apitz, Pädiatrische Kardiologie, 2002) A = Situs solitus, B = Situs inversus, C = rechtsatrialer Isomerismus, D = linksatrialer Isomerismus

1.4. Determination der Rechts- Links-Körperachse

Die Determination der Rechts-Links-Körperachse erfolgt bei Wirbeltieren bereits sehr früh. Beim Menschen ist dies in der dritten Entwicklungswoche während der so genannten *Gastrulation*, d.h. der Bildung der drei Keimblätter (Icardo 1996; Levin et al. 1995; Beddington und Robertson 1999; Ramsdell 2005). Die Determinierung der RL-Achse läuft in drei Schritten ab (Abb.9):

Schritt 1. Brechung der initial bilateralen Symmetrie des Embryos. Hierbei sollen Bewegungen von Monozilien im Bereich des Hensen-Knotens eine entscheidende Rolle spielen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Monozilien einen linksgerichteten Fluss von Extrazellulärflüssigkeit im Bereich des Hensenschen Knoten erzeugen, der eine asymmetrische Genexpression zu beiden Seiten des Hensenschen Knotens generiert (Nonaka et al. 1998; McGrath et al. 2003; Nakaya et al. 2005; Hirokawa et al. 2006).

Schritt 2. Etablierung molekularer Rechts-Links-Seitenidentitäten. Diese werden durch Signalkaskaden generiert, die sich vom Hensen-Knoten ausgehend ins Seitenplattenmesoderm ausbreiten. Hier führen sie zu einer bilateral-asymmetrischen Expression von Genen (Meno et al. 1996; Meno et al. 1997; Pagan-Westphal und Tabin 1998; Davidson et al. 1999; Franco et al. 2001; Hamada et al. 2001; Yost 2001; Harvey 2002; Franco und Campione 2003; Ramsdell 2005). Am Endpunkt dieser Signalkaskaden wird der Transkriptionsfaktor *Pitx2c* normalerweise nur im linken Seitenplattenmesoderm und den von ihm abstammenden Organanteilen exprimiert (Abb.9) (Logan et al. 1998; Yoshioka et al. 1998; Gage et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Capdevilla et al. 2000; Campione et al. 2001; Gormley et al. 2003; Nowotschin et al. 2006). *Pitx2*-Knock-out-Mäuse entwickeln einen Rechtsisomerismus der Lunge und AV-Septumdefekte (Liu et al. 2002; Lu et al. 1999; Lin et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Gage et al. 1999). Andere Mausmodelle mit Störungen in der Rechts-Links-Signalkaskade (z.B. *SHH-Knockout*) zeigen eine bilaterale Expression von *Pitx2c* im Seitenplattenmesoderm, die zu einem linksseitigen Isomerismus der Lunge und des Herzens führen (Meno et al. 1998).

Schritt 3. In der abschließenden Phase werden die **molekularen Rechts-Links-Informationen in gestaltliche Asymmetrien** übersetzt.

Während man über die ersten beiden Phasen relativ gut Bescheid weiß, ist derzeit noch weitgehend unklar, wie die molekularen Rechts-Links-Informationen in gestaltliche Asymmetrien übersetzt werden.

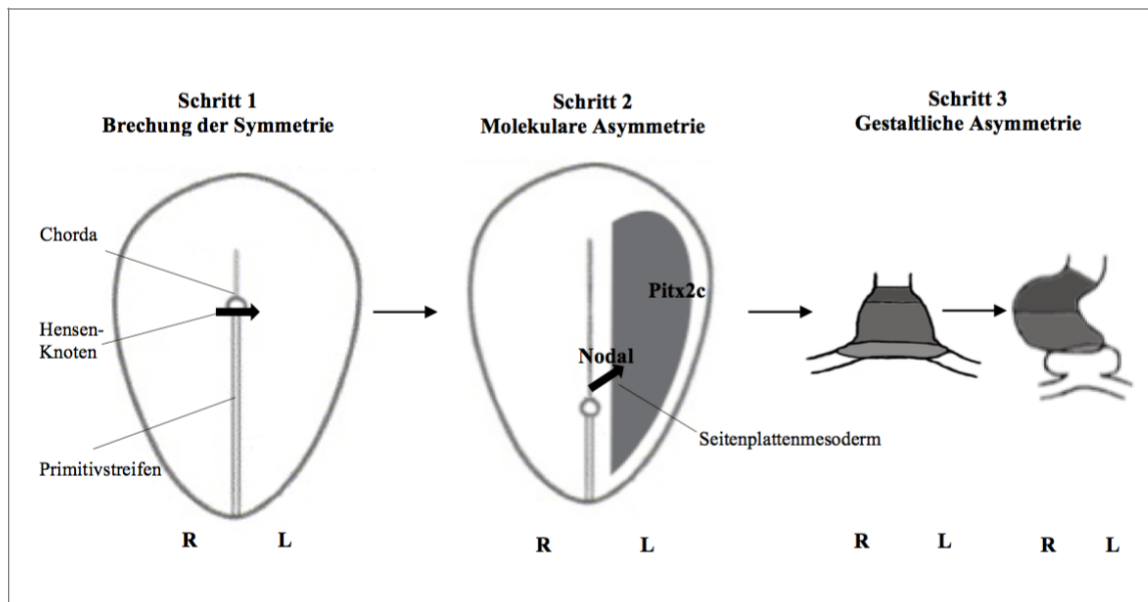


Abb. 9. Schematische Darstellung des 3-stufigen Prozesses der Determinierung der Rechts-Links-Körperachse

1.5. Rechts-Links-Achsendifferenzierung und Herzentwicklung

Bei Wirbeltierembryonen ist das Herz das erste Organ, das seine Funktion aufnimmt und eine bilateral asymmetrische Gestalt entwickelt (de la Cruz et al. 1997; Männer 2000; Christoffels et al. 2000; Hamada et al. 2002). Während der frühen Phase der Herzentwicklung nimmt der initial gerade und bilateral symmetrische Herzschlauch eine schraubig gewundene Konfiguration an, deren Windung normalerweise entgegen dem Uhrzeigersinn gerichtet ist. Dieser Prozess wird *Cardiac Looping* genannt (Patten 1922; Männer 2000, 2009). Durch das *Cardiac Looping* werden die Bauelemente des Herzens in ihre definitiven topographischen Beziehungen zueinander gebracht (Markwald 1995; de la Cruz 1998). Es wird vermutet, dass komplexe angeborene Herzfehler aus Störungen des *Cardiac Looping* resultieren. *Cardiac Looping* kann somit als ein Schlüsselvorgang in der Herzentwicklung gesehen werden (Steding und Seidl 1984; Männer 2009). Dementsprechend lässt sich die embryonale Entwicklung des Herzens grob in drei Phasen untergliedern: *Pre-Looping*, *Looping*, *Post-Looping* (Wilting und Männer 2013).

(1) **Pre-Looping**. Während dieser Phase formieren sich im Seitenplattenmesoderm die so genannten Herzfelder. Rechtes und linkes Herzfeld fusionieren in der Mittellinie des Embryos unter Bildung eines zunächst geraden und annähernd bilateral symmetrischen schlauchförmigen Herzens (DeVries und Saunders 1962, de la Cruz und Sanchez 1998; Brand 2003; Abu-Issa et al. 2004; Kirby 2007). Dieser Herzschlauch ist an seinem kaudalen Ende mit dem venösen System und am kranialen Pol mit der arteriellen Strombahn des Embryos verbunden. Er besteht lediglich aus den zukünftigen trabekulierten Abschnitten beider

Ventrikel (Wenink 1992; de la Cruz und Sanchez 1998; Christoffels et al. 2004). Hierbei liegt der embryonale rechte Ventrikel kranial vom embryonalen linken Ventrikel, der wiederum kranial des späteren AV-Kanals und der Vorhöfe liegt (Abb. 10).

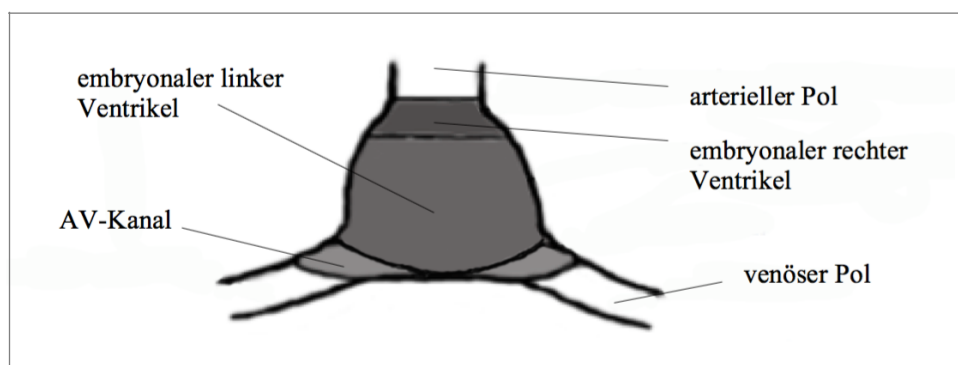


Abb. 10. Schematische Darstellung des geraden Herzschlauchs

(2) **Looping.** Während der vierten und fünften Entwicklungswoche verlängert sich der Herzschlauch durch kontinuierliche Addition von neuem Material aus beiden Herzfeldern (Harvey 2002; Kelly und Buckingham 2002; Moorman et al. 2007.) Da die Perikardhöhle nicht im selben Umfang wie der Herzschlauch wächst, erfährt der Herzschlauch eine Krümmung und Torsion und nimmt die Form einer schraubig gewundenen Herzschleife an (Taber et al. 2010). Im Zuge dieser Gestaltänderungen nähern sich Einflussbahn und Ausflusstrakt einander an, und die embryonalen Ventrikel gelangen in ihre definitive Lage kaudal der embryonalen Vorhöfe (Abb. 11) (Patten 1922; Männer et al. 1993; Männer 2000). Experimentelle Daten zeigen, dass der Windungssinn der Herzschleife durch die o.g. molekularen RL-Signale bestimmt wird (Campione et al. 1999, 2001; Pennekamp et al. 2002; Levin 2005; Wagner und Siddiqui 2007).

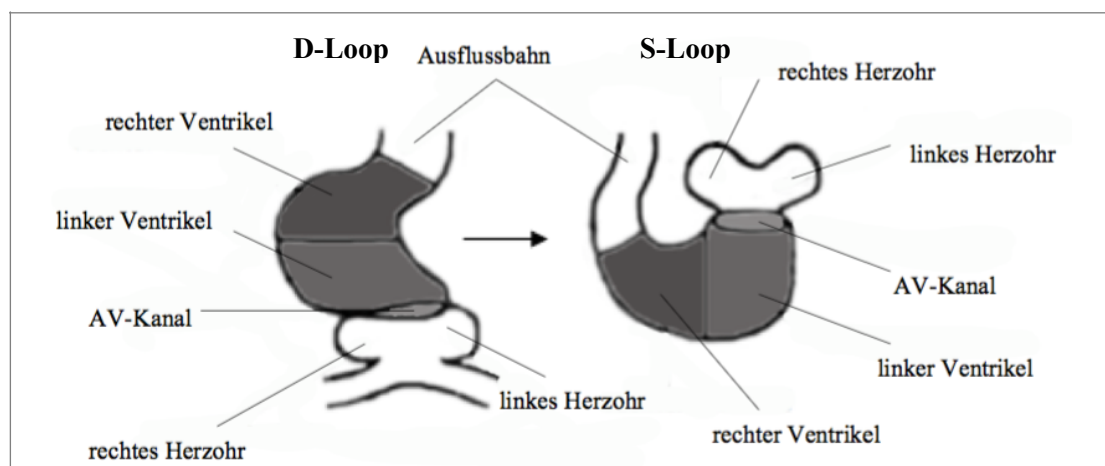


Abb. 11. Transformation des c-förmigen Herzschlauchs in den s-förmigen Herzschlauch

(3) **Post-Looping.** Diese Phase ist durch die Transformation des schlauchförmigen Herzens in ein vierkammeriges Herz mit Ausbildung der pulmonalen und systemischen Strombahnen gekennzeichnet. Drei Entwicklungsprozesse spielen dabei eine Rolle: (1.) lokale Aufweitung - sog. *Ballooning* - der Wände von Kammern und Vorhöfen, (Goor und Lillehei 1975; Christoffels et al. 2000); (2.) Entwicklung der Scheidewände (*Septierung*) und (3.) Ausbildung der Herzklappen (*Valvulogenese*).

1.6. Cardiac Looping und die Lageentwicklung der Vorhöfe und des AV-Kanals

Der embryonale Vorhof nimmt nicht am *Cardiac Looping* teil und verbleibt in seiner initialen Ausrichtung entlang der Rechts-Links-Achse. Infolgedessen korrespondieren die morphologischen Identitäten der späteren Vorhöfe mit ihrer embryonalen Herkunft aus dem rechten bzw. linken Herzfeld. Anders verhält es sich mit den Ventrikeln. Rechter und linker Ventrikel sind ursprünglich entlang der kranio-kaudalen Körperachse angeordnet (siehe oben). Somit besitzt jeder Ventrikel Anteile aus beiden Herzfeldern.

Durch das *Cardiac Looping* werden diese ursprünglichen kranio-kaudalen Identitäten der embryonalen Ventrikel in positionelle Rechts-Links-Identitäten umgewandelt (siehe oben). Dabei wird durch eine Torsion die initial rechte Wand der embryonalen Ventrikel zur Hinterwand des Kammersegments der S-förmigen Herzscherleife und die ursprüngliche linke Wand der embryonalen Ventrikel zur Vorderwand des Kammersegments der S-förmigen Herzscherleife (Abb.12). Die große Krurvatur der s-förmigen Herzscherleife entspricht somit der ursprünglichen ventralen Wand des geraden Herzscherlauchs, während die kleine Krurvatur der dorsalen Wand des geraden Herzscherlauchs entspricht (Abb. 12).

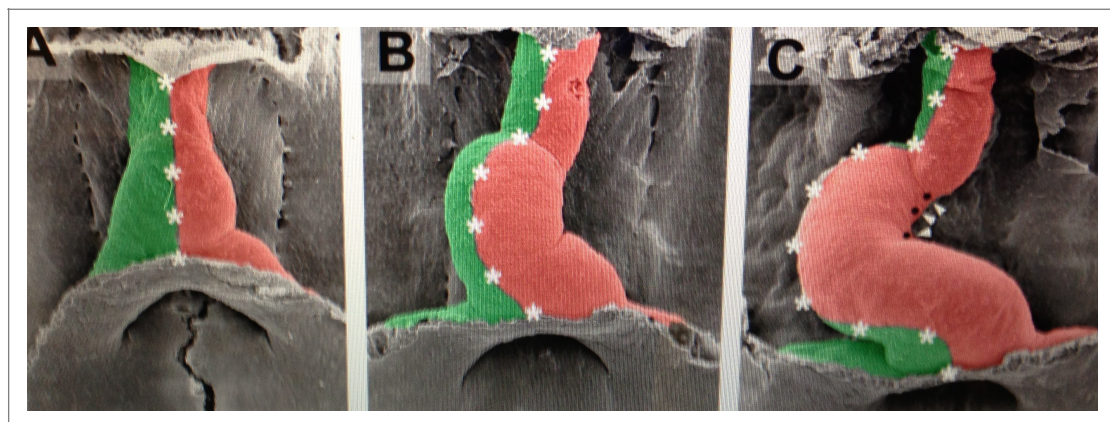


Abb. 12. Infolge der Torsion der s-förmigen Herzscherleife wird die ursprünglich rechte Wand (grün) zur Hinterwand, die ursprünglich linke Wand (rot) zur Vorderwand des Kammersegments der S-förmigen Herzscherleife. Die große Krurvatur (Sternchen) entspricht der ursprünglichen ventralen Wand, die kleine Krurvatur (weiße Pfeile auf schwarze Punkte) der dorsalen Wand des geraden Herzscherlauchs. (Abb. mit freundlicher Genehmigung aus Männer 2013)

Da die Vorhöfe in ihrer ursprünglichen Rechts-Links-Lage verbleiben, die ursprünglich rechten und linken Anteile der embryonalen Ventrikel jedoch - infolge des Cardiac Looping - zur dorsalen bzw. ventralen Kammerwand werden, ergibt sich die Frage welche Lageänderungen die ursprünglich rechten und linken Hälften des die Vorhöfe und Kammern verbindenden Segmentes, - sprich des AV-Kanals -, durch das Cardiac Looping erfahren? Aufgrund der o.g. geometrischen Verhältnisse wäre zu erwarten, dass im AV-Kanal eine Torsion stattfindet. Einige Autoren berichten jedoch, dass die gesamte Vorderwand des AV-Kanals vom linken Herzfeld und seine Hinterwand vom rechten Herzfeld abstammen (Wirtinger 1937; Wienecke et al. 1995; Ramsdell 2005; Ramsdell et al. 2005, 2006). Das linke Herzfeld würde somit das Material für das obere Endokardkissen und das rechte Herzfeld würde das Material für das untere Endokardkissen bereitstellen, während die seitlichen Endokardkissen Material aus beiden Herzfeldern erhalten würden (Abb.13). Eine Torsion müsste sich demnach stromaufwärts im Bereich der Vorhöfe finden.

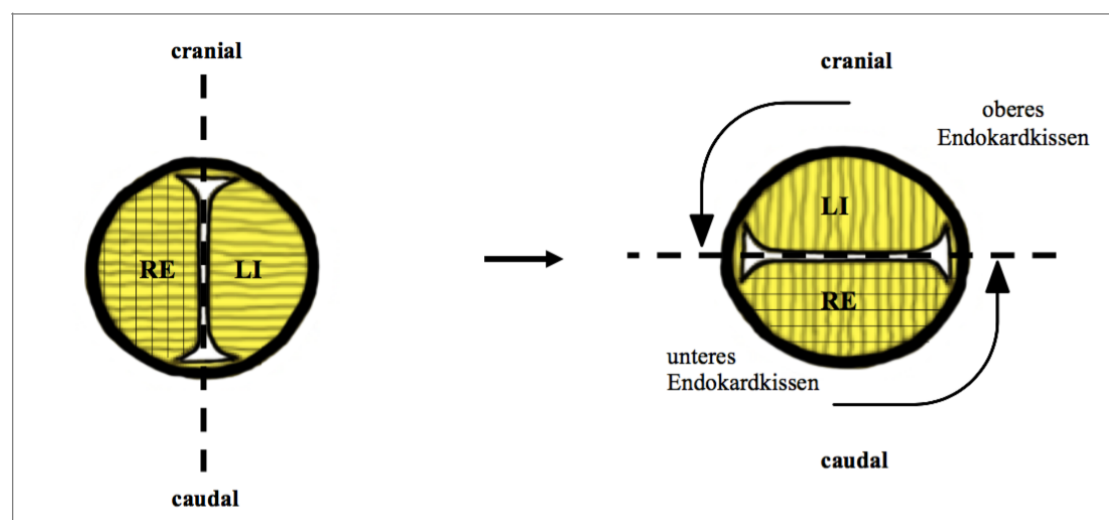


Abb. 13. Schematische Darstellung der Lageentwicklung der AV-Kissen nach Wirtinger und weiteren Autoren: Das linke Herzfeld (LI) soll Material für das obere Endokardkissen, das rechte Herzfeld (RE) soll Material für das untere Endokardkissen liefern. Die seitlichen Endokardkissen dürften demnach Material aus beiden Herzfeldern enthalten.

Studien an Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass sowohl beim Rechts- als auch beim Links-Isomerismus die Fusion der AV-Kissen meistens ausbleibt und ein gemeinsamer AV-Kanal resultiert (Kitamura et al. 1999; Liu et al. 2001; Liu et al. 2002; Weninger et al. 2005; Ramsdell et al. 2005). Auch beim Menschen findet sich beim Isomerismus fast regelhaft ein gemeinsamer AV-Kanal (Bartram et al. 2001). Sollten die oben genannten embryonalen Verhältnisse zutreffen, hätten wir es beim Rechts- und Linksisomerismus mit Situationen zu tun, bei denen das obere und untere AV-Kissen die gleichen RL-Identitäten besäßen. Die

Beobachtung, dass Isomerimus häufig mit einem gemeinsamen AV-Kanal assoziiert ist drängt nun die Vermutung auf, dass AV-Kissen gleicher RL-Identität nicht oder nur eingeschränkt miteinander fusionieren können. Die Fusion der AV-Kissen könnte entsprechend einem Schlüssel-Schloss-Prinzip ablaufen, d.h. beim Vorliegen von zwei „Schlüsseln“ oder zwei „Schlössern“ könnten sich die Endokardkissen nicht vereinigen.

In der Vergangenheit wurden die Lageänderungen des AV-Kanals während des Cardiac Looping und damit auch die Lageentwicklung der Endokardkissen nur lückenhaft dokumentiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lageänderungen des AV-Kanals während des Cardiac Looping erstmals lückenlos zu dokumentieren. Hierdurch sollte geklärt werden: **(1.)** wo die o.g. Torsion stattfindet und **(2.)** welchen Herzfeldern die AV-Kissen zugeordnet werden können.

Um die Lageänderungen des AV-Kanals während des Cardiac Looping zu dokumentieren, nutzten wir den end-systolischen Querschnitt des Endokardschlauches als anatomische Landmarke. Aufgrund einer ungleichmäßigen Verteilung der Cardiac jelly (Füllgewebe zwischen Myokardmantel und Endokardschlauch) zeigt das Lumen des embryonalen Endokardschlauchs am Ende der Systole einen schlitzförmigen Querschnitt (Abb. 14). Die Längsachse dieses Schlitzes markiert die ursprüngliche Medianebene des Herzschlauchs und damit die Grenze zwischen rechter und linker Herzhälfte (Männer et al. 2008).

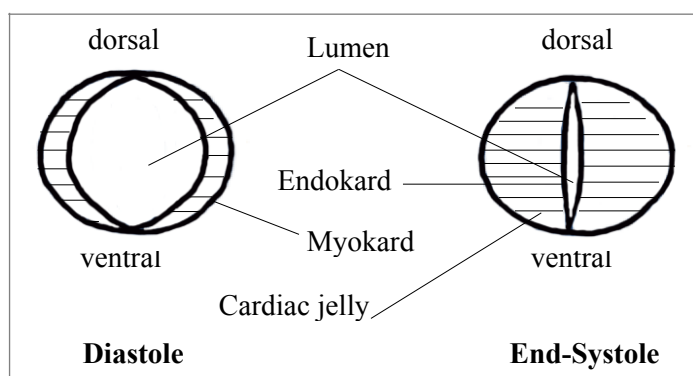


Abb. 14. Veränderung des Lumens des embryonale Endokardschlauchs während des Herzzyklus

In dreidimensionaler Darstellung erscheint ein komplett entleerter – (endsystolischer) – Endokardschlauch somit als ein flaches Band – vergleichbar mit einem Gürtel. Die Ränder dieses Gürtels markieren die ursprünglich ventrale und dorsale Mittellinie des Herzschlauchs, während dessen Flächen die ursprünglich rechten und linken Hälften des Herzschlauchs repräsentieren.

2. Material und Methoden

2.1. Hühnerembryonen

Befruchtete Hühnereier (White Leghorn, *Gallus gallus domesticus*) wurden vom Tierversuchsgut der Universität Göttingen in Holtensen bezogen. Die Inkubation der Eier erfolgte in einem Flachbrüter (Fa. Siepmann, Typ 400) bei einer Temperatur von 38 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75%. Die Stadierung der Embryonen wurde anhand des Morphologie-basierten Stadierungssystems nach Hamburger und Hamilton (Hamburger und Hamilton 1951) durchgeführt. Es wurden Embryonen des Hamburger und Hamilton (HH)-Stadiums 11 (frühes C-looping) bis HH-Stadium 18 (fortgeschrittenes S-Looping) untersucht. Jüngere Embryonen wurden nicht untersucht, da der AV-Sulcus erstmalig im HH-Stadium 11 erscheint (Castro-Quezada et al. 1972).

2.2. Präparation und Fixierung

Die Hühnerembryonen wurden nach einer Inkubationszeit von 40 (jüngste Stadien, HH-Stadium 11) bis 64 Stunden (älteste Stadien, HH-Stadium 17) aus dem Ei entnommen. Hierzu wurde die Eischale über dem Embryo eröffnet und der noch lebende Embryo mitsamt dem Dottersack in eine Petrischale überführt, die sterile Locke'sche Lösung enthielt. Nach Abspülen der Dotterreste wurde der gesäuberte Embryo mitsamt dem Dottersack in eine zweite mit Locke'scher Lösung gefüllte Petrischale überführt, deren Boden mit einer Wachsschicht überzogen war. Hierin wurde der Dottersack mitsamt dem darauf liegenden Embryo wieder in seine natürliche Form entfaltet und mit Stecknadeln auf der Wachsschicht fixiert. Hierdurch wurde verhindert, dass der Embryo während der anschließenden Präparation wegtreiben konnte. Der Embryo wurde auf äußerlich sichtbare Fehlbildungen untersucht und stadiert. Für die weitere Präparation wurden ausschließlich normal entwickelte Embryonen verwendet. Abnorme Embryonen wurden verworfen.

Das Ziel der anschließenden Präparation war es, den embryonalen Herzloop im Zustand eines möglichst komplett entleerten Endokardschlauches für die Untersuchungen zu fixieren (siehe Einleitung). Hierfür wurde - am noch lebenden Embryo - die Perikardhöhle an einer abseits des Herzschlauchs befindlichen Stelle eröffnet und die Herzoberfläche über eine Mikropipette mit Locke'scher Lösung gespült, um anhaftende Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die Stämme der Dottergefäße mit Wolframnadeln eröffnet. Durch die hiermit erzeugte Massenblutung wurde das Blutvolumen im Kreislauf, und damit verbunden auch das enddiastolische Blutvolumen im Herzen, erheblich verringert. Am leergepumpten aber noch schlagenden Herzschlauch wurde nun ein Herzstillstand in generalisierter Kontraktion

induziert. Hierzu wurde die Perikardhöhle über eine Mikropipette mit einer 2-molaren Kochsalzlösung gespült (Keller et al. 1994).

Nach Erreichen des Herzstillstandes wurde der Embryo mit einer 25%igen Glutaraldehydlösung ca. 2 min. lang äußerlich gespült. Dieser Präparationsschritt diente einer raschen chemischen Anfixierung des Embryos und verhinderte artifizielle Formänderungen, die beim weiteren Handling von unfixierten Präparaten entstehen können. Eine anschließende Begutachtung stellte sicher, dass ausschließlich Embryonen weiter verarbeitet wurden, bei denen der Herzschlauch in vollständig entleertem Zustand anfixiert worden war.

Nach 30-minütiger Fixierung in 4%iger Paraformaldehydlösung wurde der Embryo in einer 2%igen Glutaraldehydlösung mit Locke'scher Lösung für 12 Stunden fixiert, um abschließend in einer 80%igen Ethanollösung gelagert zu werden.

2.3 Dokumentation der 3D-Konfiguration des Endokardschlauches

2.3.1 Erstellung von optischen Gewebeschnittserien mittels Optischer Kohärenz Tomographie (OCT)

Zur Dokumentation der 3D-Konfiguration des Endokardschlauches wurden von den fixierten Herzen in einem ersten Schritt optische Gewebeschnittserien mittels Optischer Kohärenz Tomographie (OCT) erstellt. Die Bildgebung (B-mode OCT) erfolgte im Labor von Herrn Prof. Dr. Ing. Tobias Ortmaier (Institut für Mechatronische Systeme, Leibnitz Universität Hannover) mit Unterstützung von Dipl.-Ing. Jan Thommes. Hierbei wurde ein Thorlabs OCS 1300SS Swept Source OCT System genutzt (Systemspezifikationen: zentrale Wellenlänge 1325 nm; maximale Framerate (B-mode): 25 Bilder/Sek (512 x 512 pixel); Scandimensionen: axiale Auflösung 9 µm (im Gewebe); seitliche Auflösung 25 µm).

2.3.2 Computer gestützte 3D-Rekonstruktion

Die durch OCT gewonnenen 2D-Bilddatensätze (JPEG Format) wurden mittels der Open Source Software Image-J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/index.html>) in Tiff Format Bilder umgewandelt. Von diesen Datensätzen wurden mittels *OsiriX Imaging Software* (Osirix version 3.7.1 64-bit DICOM Bildbearbeitungssystem für Mac, OsiriX Foundation, Schweiz) virtuelle 3D-Rekonstruktionen der Endokardschläuche generiert. Hierzu wurden die Datensätze in die Software eingeladen und mittels einer 2D Bildbetrachtungssoftware bei jedem einzelnen Schnitt zunächst die Kontur des Endokards als Region of interest (ROI)

durch manuelles Umfahren der Struktur festgelegt. Die die Endokard-ROI enthaltenden Schnitte (2D) wurden mittels 3D Post-Processing einem 3D Volumen-Rending- und 3D Surface-Rending-Tool zugeführt. Somit gelang es, die einzelnen Schnitte (2D) in eine multimodale und multidimensionale Bildfolge (3D) umzuwandeln. Im Anschluss daran ließ sich die 3D Bildfolge in gängige Bildformate (TIFF, JPEG) exportieren.

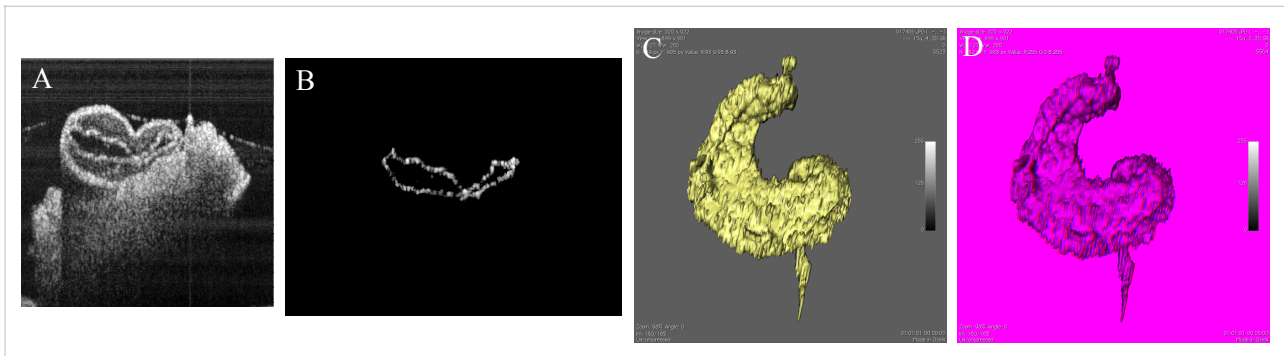


Abb. 15 3D-Rekonstruktionen der Endokardschläuche: A Embryo HH-St.15, Schnitt 179; B Schnitt 179, Region of Interest = Kontur des Endokards; C/D 3D Rekonstruktion nach Volumen- und Surface-Rending (C dreidimensional, D dreidimensional für Betrachtung mit Rot-Blau-Brille)

3. Ergebnisse

3.1 Gestalt des endsystolischen Endokardschlauchs im HH-Stadium 11

Das AV-Segment des embryonalen Herzens erscheint beim Hühnerembryo erstmals im HH-Stadium 11 am venösen Pol des Herzschlauchs (Abb. 16). Zu diesem Zeitpunkt hat das Cardiac Looping bereits begonnen, sodaß das Herz in einer Frontalansicht als c-förmige Herzschleife imponiert (Abb. 16A). Im Gebiet der Vereinigung der rechten und linken Venenstämme findet sich eine sackartige Erweiterung des Endokardlumens, die den kranialen Teil des sich bildenden Vorhofssegmentes darstellt (Abb. 16B,D). Kranial von diesem Segment kommt es beidseits zu einer Abplattung des sackartig erweiterten Endokardschlauches sowie zu einer nach rechts gerichteten Knickung.

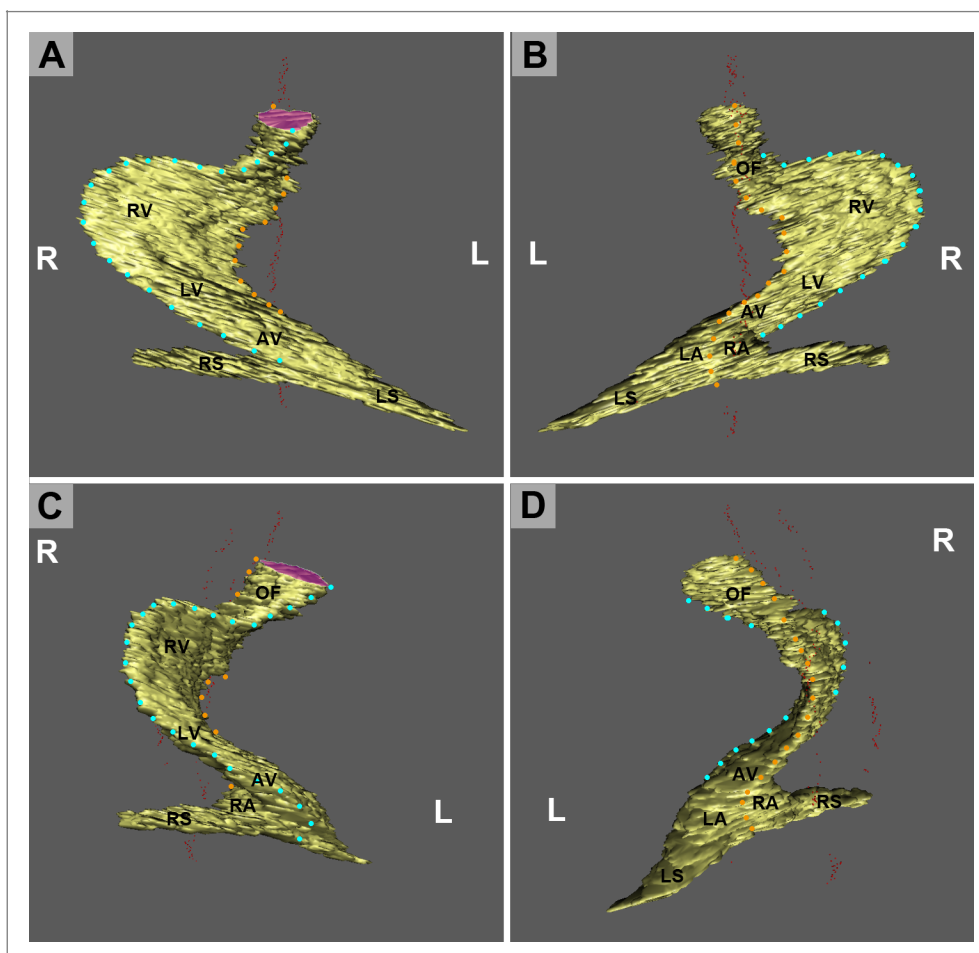


Abb.16. Topographie des embryonalen Herzschlauches während des C-Loopings. 3D-Rekonstruktionen des kontrakten Endokardschlauches im HH-Stadium 11. **A**, Frontalansicht; **B**, Dorsalansicht; **C**, Schrägansicht von Rechts-ventral; **D**, Schrägansicht von Links-dorsal. Die gepunkteten Linien markieren die ursprüngliche ventrale (hellblau) und dorsale (orange) Mittellinie des Herzschlauches. Infolge des Cardiac Looping zeigt die ursprünglich ventrale Mittellinie der embryonalen Ventrikel nach rechts (R) und bildet die große Kurvature der Kammerschleife, während die ursprünglich dorsale Mittellinie nach links (L) zeigt und die kleine Kurvature der Kammerschleife bildet. Die Grenze zwischen primitiven Atrium und AV-Kanal ist durch einen deutlichen Knick erkennbar. Beachte dass die späteren Ventrikel kranial von den späteren Vorhöfen liegen. Abkürzungen: RS = Rechter Venenstamm, LS = Linker Venenstamm, RA = Rechte Hälfte des primitiven Atriums, LA = Linke Hälfte des primitiven Atriums, AV = AV-Segment, LV = embryonaler linker Ventrikel, RV = embryonaler rechter Ventrikel, OF = Ausflusstrakt

Der Endokardschlauch hat nun in seinem weiteren Verlauf bis zum arteriellen Herzpol die Gestalt eines flachen Bandes. Sein o.g. Knick markiert den embryonalen AV-Sulcus (Abb. 16B-D). Die Ränder des Endokardbandes markieren die ursprünglich ventrale und dorsale Mittellinie des Herzschlauchs, während dessen seitliche Flächen die ursprünglich rechten und linken Hälften des Herzschlauchs repräsentieren.

Im Bereich des AV-Knicks sowie im Bereich des distalen Ausflusstraktes ist diese ursprüngliche Situation noch vorhanden (Abb. 17). Im Bereich der embryonalen Ventrikel finden sich – aufgrund des Cardiac Looping – jedoch abweichende Verhältnisse. Hier zeigt der ursprünglich ventrale Rand nach rechts und bildet die große Kurvatur der Kammerschleife, während der ursprünglich dorsale Rand nach links zeigt und die kleine Kurvatur der Kammerschleife bildet (Abb. 16, 17). Die Vorderwand der Kammerschleife wird somit von der ursprünglich linken Herzhälfte gebildet während deren Hinterwand von der ursprünglich rechten Herzhälfte gebildet wird. Die Knickungsachse des AV-Knicks liegt in der Medianebene des Embryos und verläuft annähernd in dorso-ventraler Richtung. Infolge des Knicks zeigt eine senkrecht zur Flussrichtung liegende AV-Ebene nach kranial und rechts (Abb. 17B).

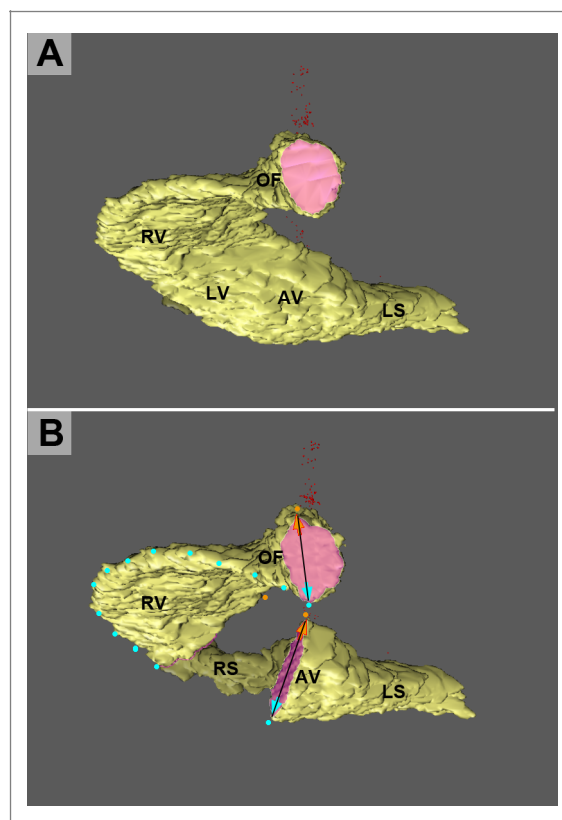


Abb.17. Topographie der AV-Ebene und des distalen Ausflusstraktes im HH-Stadium 11. 3D-Rekonstruktion des kontrahierten Endokardschlauchs in einer Ansicht von kranial. **A**, kompletter Endokardschlauch; **B**, Zur Darstellung der AV-Ebene wurde der embryonale LV entfernt. Schnittflächen in Magenta. Beachte das der Bereich des AV-Knicks und der Bereich des Ausflusstraktes nicht an der Rotation beteiligt sind; d.h. das ihre Längsachsen weiterhin annähernd in der Medianebene liegen. Abkürzungen wie in Abb. 16.

3.2 Änderungen in der Gestalt des ventrikulären Endokardschlauches infolge eines Umbaus der Cardiac jelly

Die oben beschriebene Gestalt eines endsystolisch abgeplatteten, bandförmigen Endokardschlauches erlaubt es, in den HH-Stadien 11 und 12 die durch das Cardiac Looping bedingten Lageänderungen der rechts- und linksseitigen Hälften des embryonalen Herzschlauches eindeutig zu identifizieren (Abb. 16-18).

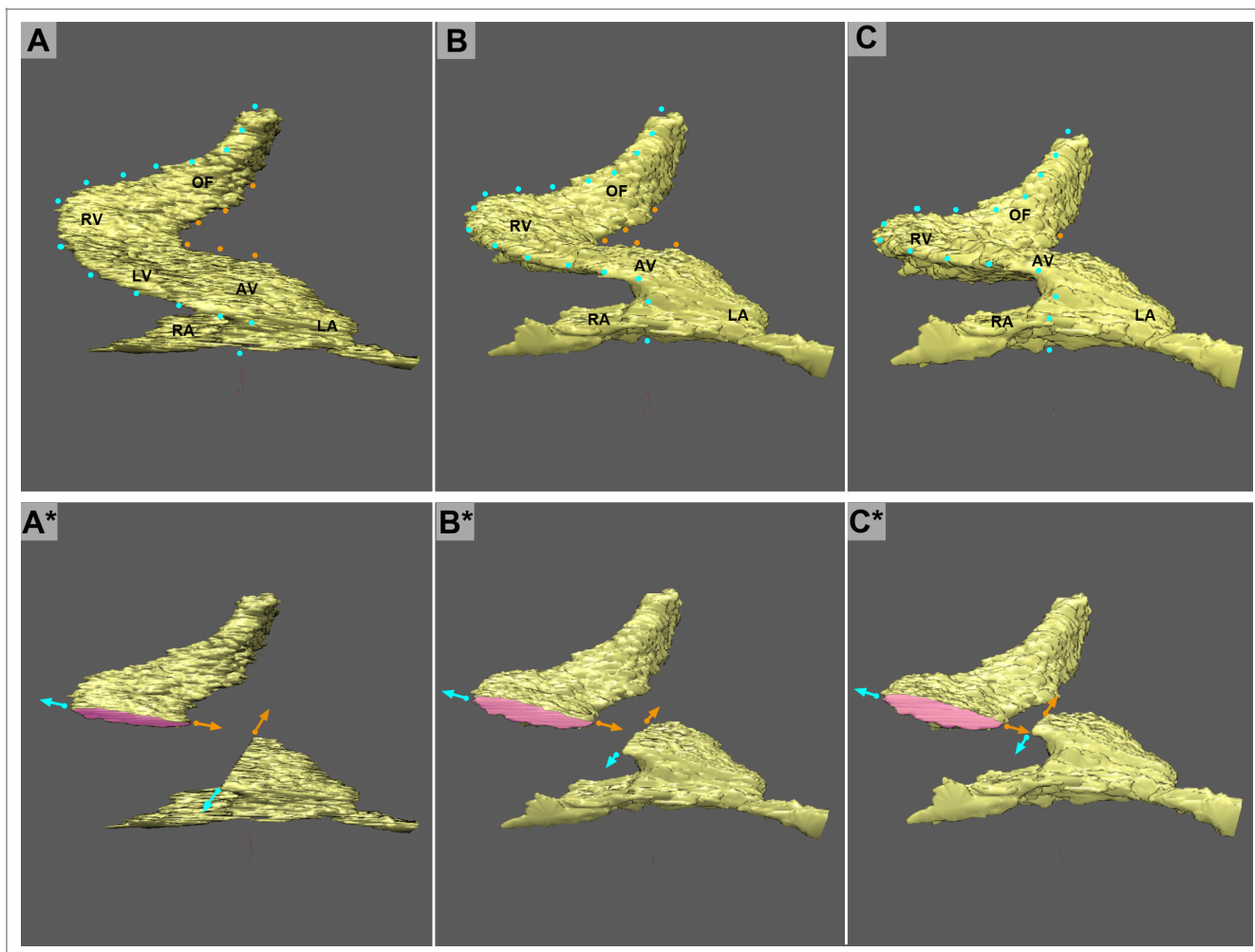


Abb.18. Gestalt des Querschnittes des endsystolischen Lumens der Kammerschleife im HH-Stadium 12. 3D-Rekonstruktionen eines kontrahierten Endokardschlauches. **A/A***, Frontalansicht; **B/B***, fronto-kaudale Ansicht; **C/C***, Kaudalansicht. A/B/C kompletter Endokardschlauch, A*/B*/C* Kammerschleife entfernt. Der systolische Querschnitt des Lumens der Kammerschleife weist eine schlitzz- bzw. spindelförmige Gestalt auf. Lageänderungen der rechts- und linksseitigen Hälften des embryonalen Herzschlauches: Durch das Cardiac Looping wird die Vorderwand der Kammerschleife von der ursprünglich linken Herzhälfte gebildet während deren Hinterwand von der ursprünglich rechten Herzhälfte gebildet wird. Die gepunkteten Linien markieren die ursprüngliche ventrale (hellblau) und dorsale (orange) Mittellinie des Herzschlauches. Die Pfeile verdeutlichen dabei die Lageveränderung des AV-Kanals ausgehend von der Medianebene des Embryos (hellblau = ventraler Pol, orange = dorsaler Pol). Abkürzungen wie in Abb. 16.

Im Verlauf der anschließenden Entwicklungsphasen jedoch wird die den Endokardschlauch umgebende Cardiac jelly umgebaut. Hierdurch ändert sich die Gestalt des Endokardschlauches im Bereich der großen Krümmung der Kammerschleife. Ohne Kenntnis dieser Gestaltänderungen lassen sich die, durch das Cardiac Looping bedingten, Lageänderungen des AV-Kanals nicht exakt nachvollziehen. Im Folgenden wird daher zunächst der Umbau der Cardiac jelly beschrieben. Hieran schließt sich dann die Beschreibung der Lageänderungen des AV-Kanals an.

Der o.g. Umbau der Cardiac jelly ist dadurch gekennzeichnet, dass zu beiden Seiten der ursprünglich ventralen Mittellinie des Herzschlauches spaltförmige Endokardausläufer in Richtung auf die Myokardwand auswachsen (Männer et al. 2009). Der systolische Querschnitt des Lumens der Kammerschleife verliert hierdurch seine ursprünglich schlitzförmige Gestalt und nimmt die Gestalt eines lateinischen Kreuzes bzw. Drachenvierecks an, dessen Längsachse die ursprüngliche Medianebene repräsentiert (Abb. 19A*-C*). Am 3-dimensionalen Endokardschlauch imponieren die seitlichen Endokardausläufer als zwei Leisten die parallel zur ursprünglich ventralen Mittellinie verlaufen, wobei die eine in der ursprünglich linken Herzhälfte und die andere in der ursprünglich rechten Herzhälfte liegt (Abb. 19A-C). Diese neu aufgetretenen Leisten werde ich im folgenden als ventrale („linke“) und dorsale („rechte“) Nebenleisten der großen Krümmung benennen, die ursprünglich vorhandene ventrale Randleiste wird als mediane Hauptleiste der großen Krümmung bezeichnet.

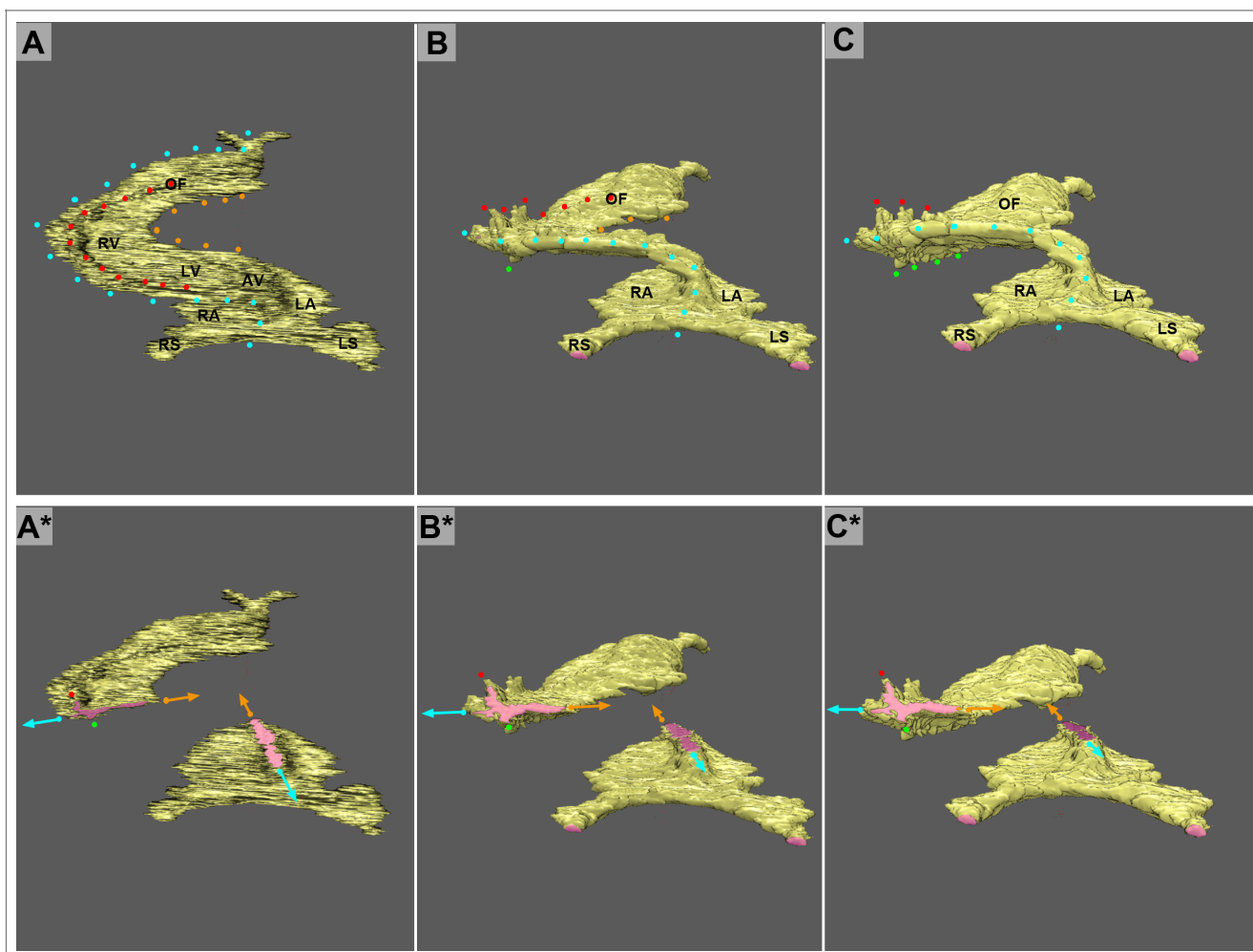


Abb.19. Gestaltänderungen des Querschnittes des endsystolischen Lumens der Kammerschleife infolge des Umbaus der Cardiac jelly im HH-Stadium 14. 3D-Rekonstruktionen eines kontraktiven Endokardschlauchs. **A/A*** Frontalansicht, **B/B*** fronto-kaudale Ansicht, **C/C*** Ansicht von kaudal; **A/B/C**, kompletter Endokardschlauch; **A*/B*/C***, Kammerschleife entfernt. Infolge des Umbaus der Cardiac jelly hat der Querschnitt des Lumens der kontraktiven Kammerschleife seine ursprünglich schlitzförmige Gestalt verloren und die Gestalt eines lateinischen Kreuzes angenommen (**A*/B*/C***). Im 3D-Bild (**A/B/C**) erscheinen die seitlichen Endokardausläufer (rote bzw. grüne Punkte) als Leisten die ventral (rot gepunktete Linie) und dorsal (grün gepunktete Linie) von der ursprünglichen Mittellinie (blau gepunktete Linie) der Kammerschleife verlaufen. Der systolische Querschnitt des Lumens des AV-Kanals weist eine schlitzförmige Gestalt auf. Die Pfeile verdeutlichen dabei die Lageveränderung der Kammerschleife ausgehend von der Medianebene des Embryos (hellblau = ursprünglich ventraler Pol, orange = ursprünglich dorsaler Pol). Abkürzungen wie in Abb. 16.

Der Umbau der Cardiac jelly findet sich zuerst im Ausflusstrakt (HH-Stadium 13/14, Abb. 19). Von hier ausgehend setzt er sich stromaufwärts in Richtung auf den AV-Kanal fort (ab HH-Stadium 15/16; Abb. 20). Allerdings wächst von den beiden Nebenleisten lediglich die ventrale („linke“) Nebenleiste bis in den AV-Kanal vor. Der Querschnitt der AV-Ebene ähnelt daher ab dem HH-Stadium 16 einem ungleichseitigen Dreieck (Abb. 20A*-C*). Am isolierten 2-dimensionalen Endokardquerschnitt des AV-Kanals lässt sich somit ab dem HH-Stadium 16

nicht mehr eindeutig klären, welche der beiden an der großen Kurvatur gelegenen Ecken dieses Dreieckes die ursprüngliche ventrale Mittellinie repräsentiert. Betrachtet man den dreieckigen Querschnitt des AV-Lumens jedoch im 3-dimensionalen Gesamtbild, so lässt sich die dorsal gelegene Spitze eindeutig als Teil der medianen Hauptleiste identifizieren während die ventral gelegene Spitze zur ventralen Nebenleiste gehört (Abb.: 20C+C*).

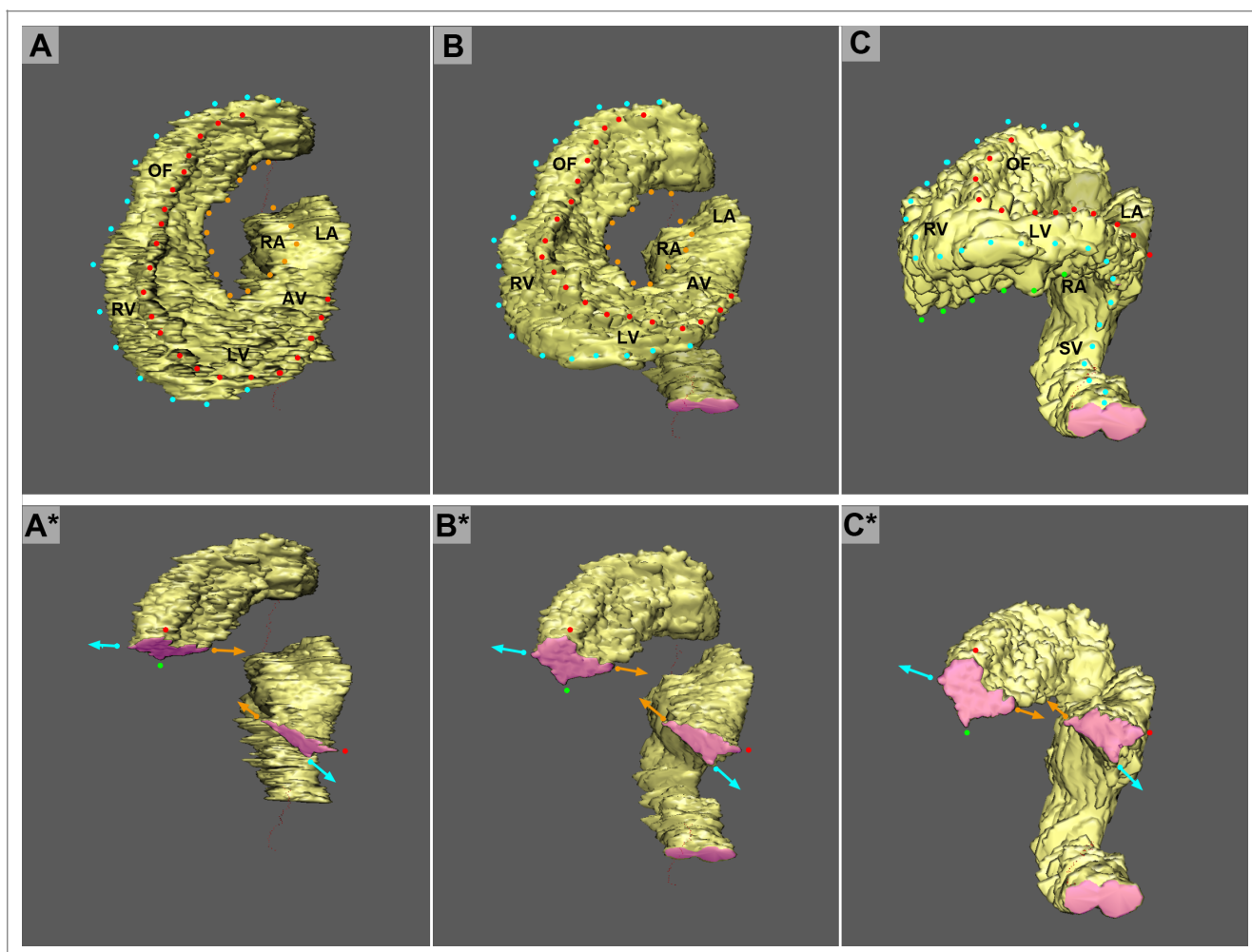


Abb.20. Gestaltänderungen des Querschnittes des endsystolischen Lumens der Kammerschleife infolge des Umbaus der Cardiac jelly Im HH-Stadium 15/16. 3D-Rekonstruktionen eines kontraktiven Endokardschlauchs. **A/A***, Frontalansicht; **B/B***, fronto-kaudale Ansicht; **C/C*** Ansicht von kaudal. **A/B/C**, kompletter Endokardschlauch, **A*/B*/C***, Kammerschleife entfernt. Nur die ventrale Nebenleiste (rot gepunktete Linie) hat sich bis in den AV-Kanal ausgedehnt. Der Querschnitt der AV-Ebene ähnelt ab dem HH-Stadium 16 einem ungleichseitigen Dreieck. Die Pfeile verdeutlichen dabei die Lageveränderung der Kammerschleife ausgehend von der Medianebene des Embryos (hellblau = ursprünglich ventraler Pol, orange = ursprünglich dorsaler Pol). Abkürzungen wie in Abb. 16.

3.3. Lageänderungen des AV-Kanals während der HH-Stadien 11-18

Die während der HH-Stadien 11 bis 17 ablaufenden komplexen räumlichen Lageänderungen des AV-Kanals lassen sich vereinfachend als einen Prozess beschreiben, der sich aus zwei Einzelkomponenten zusammensetzt: (1.) einer Schwenkung um eine transversale Achse; und (2.) einer Torsion im Bereich des AV-Kanals. Im Folgenden werden diese Komponenten isoliert beschrieben.

3.3.1 „Schwenkung“ der AV-Ebene

Als AV-Ebene des embryonalen Herzschlauches bezeichne ich eine gedachte Ebene die senkrecht zur Flussrichtung im AV-Kanal liegt. Zu Beginn des Cardiac Looping (HH-Stadium 11) zeigt die stromabwärts gerichtete, d.h. ventrikuläre Fläche der AV-Ebene nach kranial und rechts (Abb. 17B). Hierin spiegelt sich die ursprünglich kranial vom primitiven Atrium gelegene Position der embryonalen Ventrikel wider. Im weiteren Verlauf des Cardiac Looping gelangen die embryonalen Ventrikel aus dieser primitiven Lage in ihre definitive Position kaudal der Atrien. Die AV-Ebene erlebt hierbei eine Lageänderung, die sich als eine Schwenkung um eine transversale Achse beschreiben lässt.

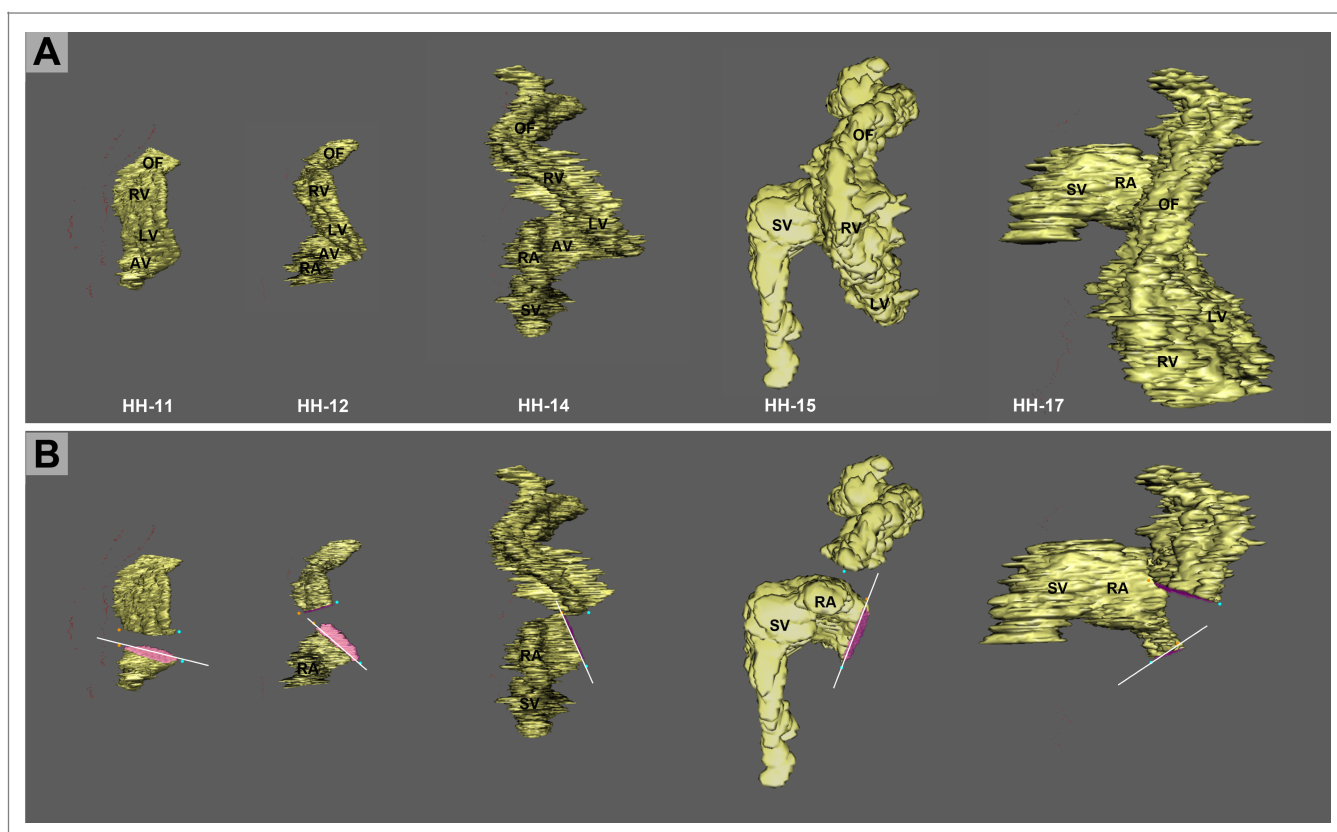


Abb.21. Verlagerung der AV-Ebene während des Cardiac Looping. 3D-Rekonstruktionen von kontraktiven Endokardschläuchen in der Ansicht von rechts lateral (HH-Stadien 11-17). **A**, vollständiger Schlauch; **B**, Schlauch nach Entfernung der Kammerschleife. Schnittflächen in Magenta. Indem die embryonalen Ventrikel während des Cardiac Looping aus ihrer ursprünglich kranial vom primitiven Atrium gelegenen Position in die definitive Position kaudal der Atrien gelangen, erfährt die AV-Ebene (= weiße Linie) eine Schwenkung um eine transversale Achse. Abkürzungen wie vorgenannt.

Als charakteristische Zwischenstationen in diesem Prozess sei das HH-Stadium 14 beschrieben, in dem die AV-Ebene in einer Frontalebene liegt, wobei ihre ventrikuläre Fläche nach ventral zeigt (Abb. 19A, 21, 22). Den Endpunkt dieses Schwenkungsprozesses stellt das HH-Stadium 17 dar, in dem die AV-Ebene in einer Transversalebene liegt, wobei ihre ventrikuläre Fläche nach kaudal zeigt (Abb. 21, 22).

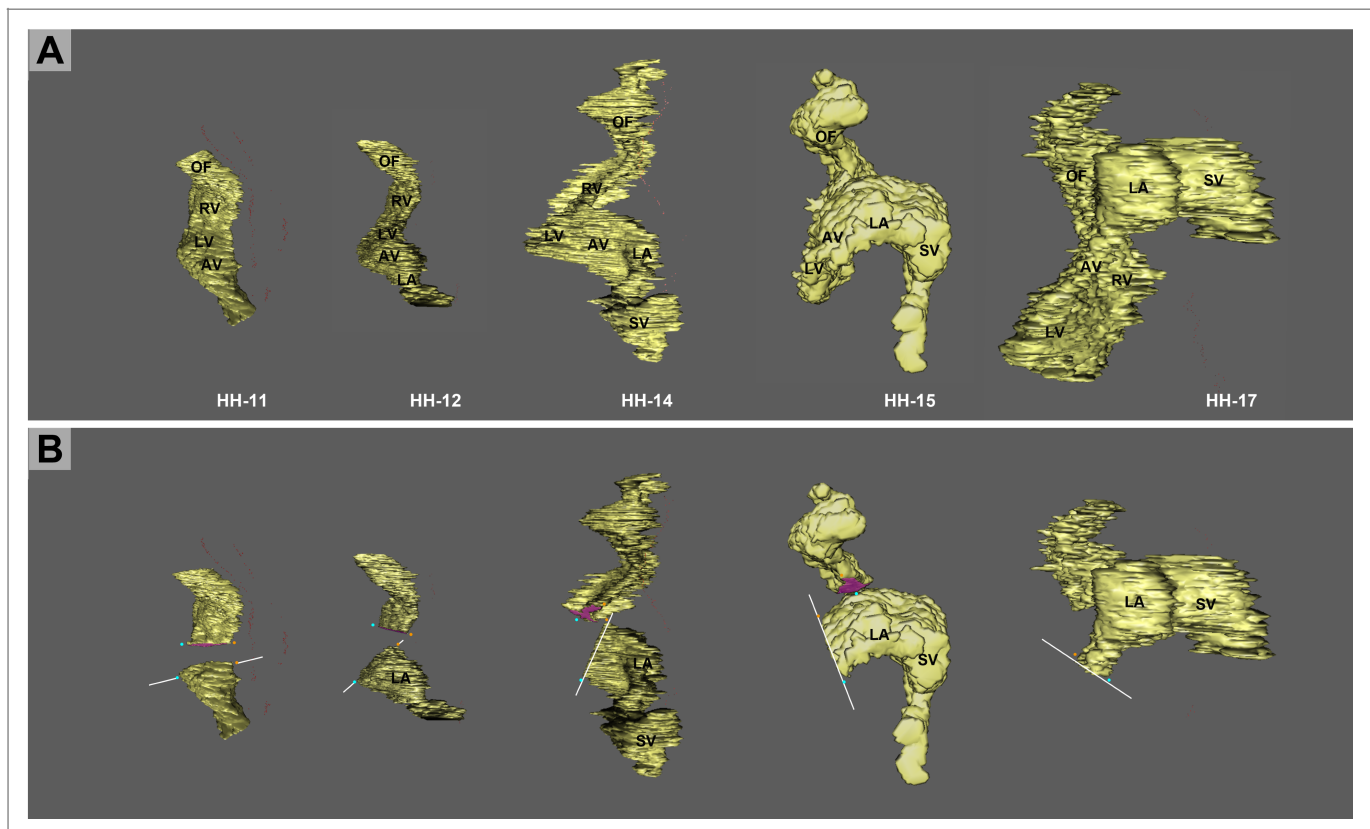


Abb.22 Verlagerung der AV-Ebene während des Cardiac Looping. 3D-Rekonstruktionen von kontraktiven Endo-kardschläuchen in der Ansicht von links lateral (HH-Stadien 11-17). **A**, vollständiger Schlauch; **B**, Schnittfläche in Höhe der AV-Ebene. LV entfernt. Indem die embryonalen Ventrikel während des Cardiac Looping aus ihrer ursprünglich kranial vom primitiven Atrium gelegenen Position in die definitive Position kaudal der Atrien gelangen, erfährt die AV-Ebene (= weiße Linie) eine Schwenkung um eine transversale Achse. Abkürzungen wie vorgeannt.

3.3.2. Torsion im Bereich des AV-Kanals

Bei der Torsion wird die Ebene des schlitzförmigen endsystolischen Herzlumens, die die Grenze zwischen den aus dem rechten und linken Herzfeldern stammenden Hälften des Herzschlauches markiert, von ihrer initial sagittalen Ausrichtung in eine annähernd frontale Ausrichtung verlagert (Abb. 23).

Die Torsion des embryonalen AV-Kanals lässt sich am besten anhand der Richtungsänderungen der Längsachse des endsystolischen AV-Schlitzes verfolgen. Meine Beschreibung dieser Änderungen beschränkt sich auf die HH-Stadien 11, 14 und 17.

Im HH-Stadium 11 (Ausgangspunkt) zeigt die AV-Längsachse noch ihre ursprüngliche dorso-ventrale Ausrichtung (Abb. 17B, Abb. 23 A1). Die ursprünglich linke Hälfte des AV-Kanals zeigt somit nach links während seine ursprünglich rechte Hälfte nach rechts gerichtet ist.

Im HH-Stadium 14 (Intermediäres Stadium der Torsion) zeigt der ursprünglich dorsale Pol der AV-Längsachse nach kranial und rechts während der ursprünglich ventrale Pol nach kaudal und links zeigt (Abb. 23 B2, C2). Die Ebene des endsystolischen AV-Schlitzes liegt somit nicht mehr in einer Sagittalebene sondern hat eine leichte Torsion erfahren. Die ursprünglich linke Hälfte des AV-Kanals zeigt nun nach links und kranial, während seine ursprünglich rechte Hälfte nach rechts und kaudal gerichtet ist.

Im HH-Stadium 17 (Endpunkt der Torsion) zeigt der ursprünglich dorsale Pol der AV-Längsachse nach rechts und ventral während der ursprünglich ventrale Pol nach links und dorsal zeigt (Abb. 23, C3). Die Ebene des endsystolischen AV-Schlitzes hat sich somit einer Frontalebene angenähert. Infolgedessen zeigt die ursprünglich linke Hälfte des AV-Kanals nun nach ventral und links, während seine ursprünglich rechte Hälfte nach dorsal und rechts gerichtet ist.

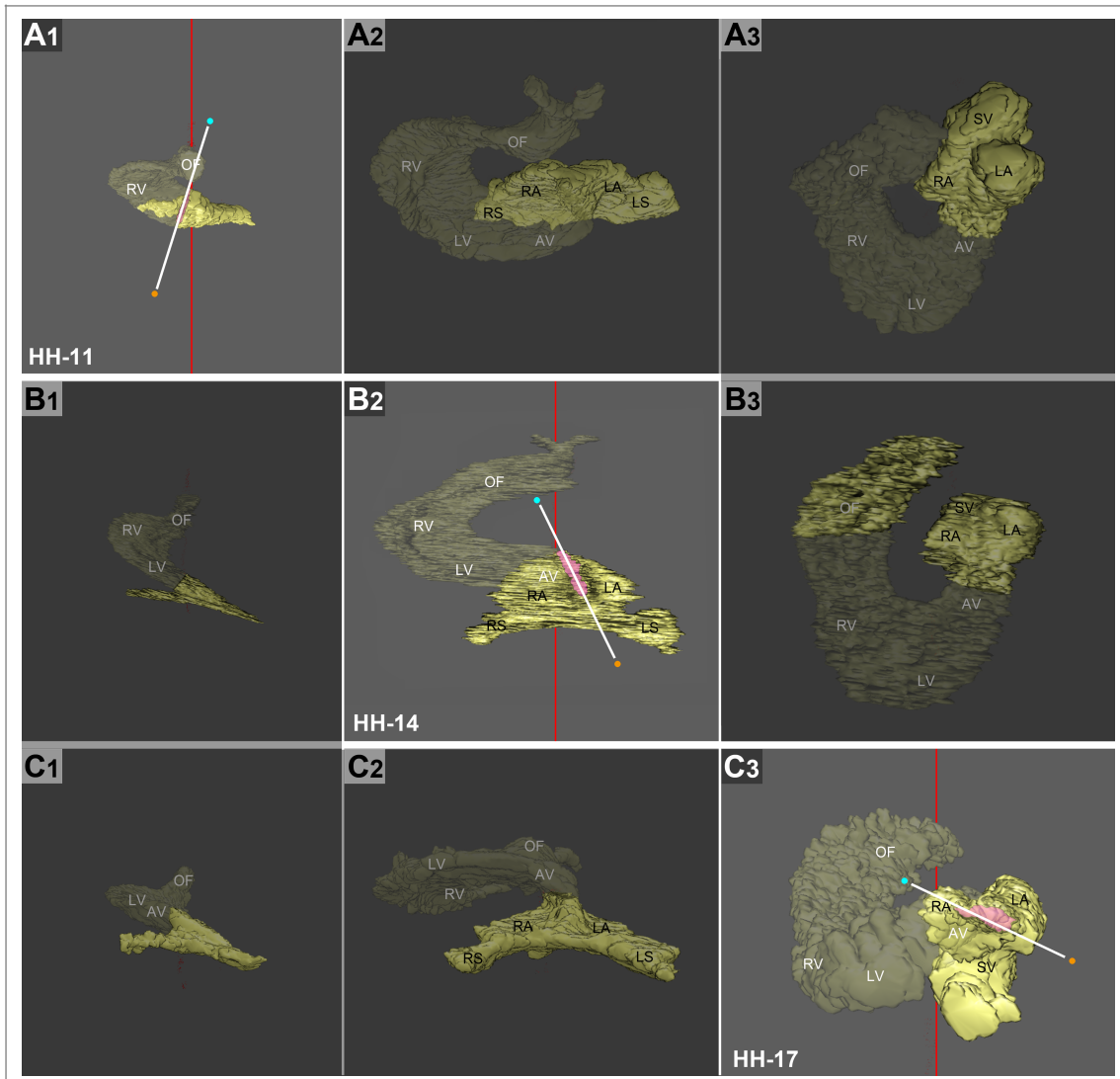


Abb. 23 Torsion des AV-Kanals während des Cardiac Looping. 3D-Rekonstruktionen von kontraktiven Endokardschläuchen. Zur Darstellung des Querschnittes des AV-Kanals wurden die distal von ihm gelegenen Teile des Herzschlauchs entfernt (Schnittflächen in Magenta). Zur besseren räumlichen Orientierung wurden die entfernten Teile transparent dargestellt. Ansichten von kranial (A1,A2,A3), ventral (B1,B2,B3) und kaudal (C1,C2,C3). HH-Stadien 11 (A1,B1,C1), 14 (A2,B2,C2) und 17 (A3,B3,C3). Aufgrund der Schwenkung kommt die AV-Ebene im HH-Stadium 11 in der kranialen (A1), im HH-Stadium 14 in der frontalen (B2), und im HH-Stadium 17 in der kaudalen Ansicht (C3) zur Darstellung (hell hervorgehobene Abbildungen). **A1**, Ausgangssituation: Während des C-Loopings besitzt die Längsachse des endsystolischen AV-Schlitzes noch ihre ursprüngliche dorso-ventrale Ausrichtung. **B2**, Intermediäres Stadium: Der ursprünglich dorsale Pol des endsystolischen AV-Schlitzes zeigt nach kranial und rechts während der ursprünglich ventrale Pol nach kaudal und links zeigt. **C3**, Endpunkt: Der ursprünglich dorsale Pol des endsystolischen AV-Schlitzes zeigt nach rechts und ventral während der ursprünglich ventrale Pol nach links und dorsal zeigt. Weiße Linie = Längsachse des endsystolischen AV-Schlitzes, oranger Punkt = ventraler Pol, hellblauer Punkt = dorsaler Pol. Dabei markiert die rote Linie die Medianebene des Embryos. Weitere Abkürzungen wie vorgenannt.

4. Diskussion

4.1. Lageänderungen des AV-Kanals während der Herzschleifenbildung

In der vorliegenden Arbeit wurden die komplexen Lageänderungen des embryonalen AV-Kanals während des Cardiac Looping erstmals lückenlos beim Hühnerembryo dokumentiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass während des Cardiac Looping Lageänderungen stattfinden, die im wesentlichen aus zwei Komponenten bestehen: (1.) einer Schwenkung der AV-Ebene; und (2.) einer Torsion (Rotation) im Bereich des AV-Kanals.

Bei der Schwenkung wird die AV-Ebene um eine Horizontalachse „gekippt“, so dass ihre ursprünglich nach kranial gerichtete Fläche am Ende des Loopings nach kaudal gerichtet ist (Abb. 21A,B; 22A,B). Diese Schwenkung spiegelt die Verlagerung der embryonalen Ventrikel aus ihrer ursprünglich kranial der Vorhöfe gelegenen Position in ihre definitive, kaudal der Vorhöfe gelegene Position wider (Abb. 21A,B; 22A,B).

Bei der Torsion wird die Ebene des schlitzförmigen endsystolischen Herzlumens, welche die Grenze zwischen den aus dem rechten und linken Herzfeldern stammenden Hälften des Herzschlauches markiert, von ihrer initial sagittalen Ausrichtung in eine annähernd frontale Ausrichtung verlagert. Da das Ausmaß dieser Torsion im AV-Kanal deutlich weniger als 90° beträgt wird keine vollständige frontale Ausrichtung sondern lediglich eine Schrägstellung des endsystolischen „AV-Schlitzes“ erreicht (Abb. 23).

Aufgrund der oben beschriebenen räumlichen Verlagerungen des endsystolischen AV-Schlitzes ist zu schließen, dass – am Ende des Cardiac Loopings – die ursprünglich linke Hälfte des Herzschlauches die Vorderwand sowie die linke seitliche Wand des AV-Kanals bildet, während die ursprünglich rechte Hälfte des Herzschlauches die Hinterwand sowie die rechte seitliche Wand des AV-Kanals bildet (Abb. 17). Die zu diesen Wänden gehörenden AV-Kissen dürften dementsprechend folgende Herkünfte haben: (1.) oberes AV-Kissen - linkes Herzfeld; (2.) unteres AV-Kissen - rechtes Herzfeld; (3.) rechtes seitliches AV-Kissen - rechtes Herzfeld; und (4) linkes seitliches AV-Kissen - linkes Herzfeld. Diese Zuordnungen konnten nach Abschluss meiner Arbeiten im Labor von PD. Dr. Männer im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit durch in situ Hybridisierungen mit einer Pitx2-Sonde bestätigt werden (noch unpublizierte Daten aus der AG Cardio-Embryologie).

Die oben beschriebenen Befunde stehen im Einklang mit Angaben in früheren Publikationen, in denen berichtet wird, dass das vordere AV-Kissen aus dem linken Herzfeld und das hintere AV-Kissen aus dem rechten Herzfeld stammt (Bremer 1928; Chang 1932; Wirtinger 1937;

Pernkopf und Wirtinger 1933; Rosenquist et al. 1966; Wienecke et al. 1995; Ramsdell 2005; Ramsdell et al. 2005, 2006; Dominguez et al. 2012). Meine Daten scheinen andererseits jedoch auch im Widerspruch zu einigen Angaben in früheren Publikationen zu stehen. So berichten mehrere Autoren, dass der AV-Kanal während des Cardiac Looping eine Rotation um 90° erfahren soll und damit eine deutlich stärkere Torsion durchmachen würde, als meine Befunde nahelegen (Bremer 1928; Chang 1932; Wirtinger 1937; Pernkopf und Wirtinger 1933). Auch Lehrbucheschemata zeigen üblicherweise eine 90°-Querstellung des schlitzförmigen Lumens des AV-Kanals (Abb. 2 in Kapitel 6 in Drews 2006; Abb.13.14 in Sadler 2008). Sollte der AV-Kanal tatsächlich eine Torsion um 90° erfahren, so würde dies bedeuten, dass man den beiden seitlichen AV-Kissen keine unilateralen, sondern gemischte Herkünfte aus beiden Herzfeldern zuordnen müsste (siehe Abb.13). Aufgrund einer umfangreichen Analyse der bestehenden Primärliteratur bin ich jedoch zu der Überzeugung gelangt, dass die auf meinen Daten beruhende Zuordnung der Herkunft der seitlichen AV-Kissen korrekt sein dürfte. So konnte ich (1.) eine meinen Befunden entsprechende Schrägstellung des AV-Kanals in früher publizierten Abbildungen von Herzen menschlicher Embryonen (Abb. 2 in Kim et al. 2001) und von Mausembryonen (Abb. 5D in de Lange et al. 2004; Abb. 2 in Furtado et al. 2008; Abb. 4 in Furtado et al. 2011) finden. (2.) Fate-mapping Studien an Mausembryonen konnten zeigen, dass Zellen aus dem linken Herzfeld das vordere und das linke seitliche AV-Kissen besiedeln, während Zellen aus dem rechten Herzfeld das hintere AV-Kissen besiedeln (Dominguez et al. 2012).

Zusammenfassend lassen sich meine Befunde folgendermaßen interpretieren: während des Cardiac Loopings erfährt der AV-Kanal komplexe räumliche Verlagerungen infolge derer die ursprünglich linke Herzanlage die obere und linke seitliche Wand des AV-Kanals sowie die hierzu gehörenden AV-Kissen (oberes und linkes seitliches AV-Kissen) bildet. Die ursprünglich rechte Herzanlage bildet die untere und rechte seitliche Wand des AV-Kanals sowie die hierzu gehörenden AV-Kissen (unteres und rechtes seitliches AV-Kissen).

Es stellt sich nun die Frage, was diese Befunde zum Verständnis der normalen und gestörten Herzentwicklung beitragen könnten.

4.2. Bedeutung für das Verständnis der normalen und gestörten Herzentwicklung

4.2.1. Normale und gestörte Septierung des AV-Kanals

Die Unterteilung der initial ungeteilten Strombahn des embryonalen AV-Kanals in „rechte“ und „linke“ Strombahnen geschieht normalerweise durch Fusion des oberen und unteren AV-

Kissen, wobei dieser Fusionsprozess durch Mesenchym aus der DMP unterstützt wird (Lamers und Moorman 2002; Snarr et al. 2007a, 2007b; Briggs et al. 2012). Bekannt ist, dass bei Herzen mit atrialen Isomerien häufig AV-Septumdefekte gefunden werden (Lu et al. 1999; Lin et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Gage et al. 1999; Bartram et al. 2001). Untersuchungen an Mausmodellen haben gezeigt, dass hierbei die Fusion der AV-Kissen ausbleibt (Meno et al. 1998). Die oben diskutierten Befunde zeigen, dass das obere und untere AV-Kissen im Normalfall unterschiedliche RL-Seitenidentitäten besitzen. Es ist daher anzunehmen, dass bei Herzen mit atrialen Isomerien oberes und unteres AV-Kissen die gleiche RL-Identität besitzen. Da in diesen Fällen offensichtlich die Fusion der AV-Kissen ausbleibt, kann man spekulieren, dass AV-Kissen gleicher RL-Identität nicht oder nur eingeschränkt miteinander fusionieren können.

Es stellt sich nun die Frage, welche zellulären und molekularen Mechanismen für eine eingeschränkte Fusionsfähigkeit von AV-Kissen mit derselben RL-Identität verantwortlich sein könnten.

Bisher ist bekannt, dass sich die beiden AV-Kissen im Volumen und der Menge an Mesenchymzellen sowie der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (*JB3 / Fibrillin*) unterscheiden (Wunsch et al. 1994; Smith et al. 1997; Rongish et al. 1998). So soll bei Hühnerembryonen das untere AV-Kissen mehr Zellen als das obere AV-Kissen enthalten (Miyabara 1990; Hiltgen et al. 1996; Wienecke et al. 1995; Webb et al. 1996; Moreno-Rodriguez et al. 1997); wohingegen das obere AV-Kissen bei Mäusen ein größeres Volumen haben soll als das untere Endokardkissen (Webb et al. 1996).

PITX2-Knock-out-Mäuse sind ein Tiermodell für Rechtsisomerismus (Lu et al. 1999; Lin et al. 1999; Kitamura et al. 1999; Gage et al. 1999). Shiratori und Koautoren konnten an 12,5 Tage alten *PITX2-Knock-out*-Mausembryonen zeigen, dass der in diesem Modell auftretende AV-Kanaldefekt auf eine fehlende Fusion der beiden AV-Kissen zurückzuführen ist, wobei der Fusionsdefekt auf einer Hypoplasie des oberen AV-Kissen beruht während das untere AV-Kissen ein normales (d.h. im Vergleich zum normalen oberen AV-Kissen, kleines) Volumen besitzt (Shiratori et al. 2006). In Anbetracht der o.g. Befunde liegt es nahe anzunehmen, dass wir es hier mit zwei morphologisch unteren (volumenarmen) AV-Kissen, d.h. AV-Kissen mit rechter Seitenidentität, zu tun haben (Abb.27A,B). Es fällt daher relativ leicht, die Pathogenese von AV-Kanaldefekten bei Rechtsisomerismus auf zwei morphologisch identische untere AV-Kissen mit geringen Volumina zurückzuführen.

Sollte das Volumen der AV-Kissen der entscheidende Faktor für deren Fusionsfähigkeit sein, so ergäben sich aus den o.g. Fakten möglicherweise Erklärungsprobleme beim

Linksisomerismus. Hier würde man nämlich erwarten, dass sich während der Embryonalentwicklung zwei volumenreiche, d.h. morphologisch obere (Linksseitenidentität), AV-Kissen bilden von denen man eigentlich erwarten würde, dass sie besonders gut in Kontakt kommen und miteinander fusionieren könnten (Abb.27B). Trotz umfangreicher Literaturrecherche konnte ich keine Angaben zu den Volumina der AV-Kissen bei Tiermodellen mit Linksisomerismus finden. Sollten jedoch bei Embryonen mit Linksisomerismus tatsächlich zwei AV-Kissen mit großen Volumina vorhanden sein, dann könnte man vermuten, dass die Fusionsprobleme aus der geringeren Zellzahl der AV-Kissen mit größeren Volumina (= oberes AV-Kissen) herrühren.

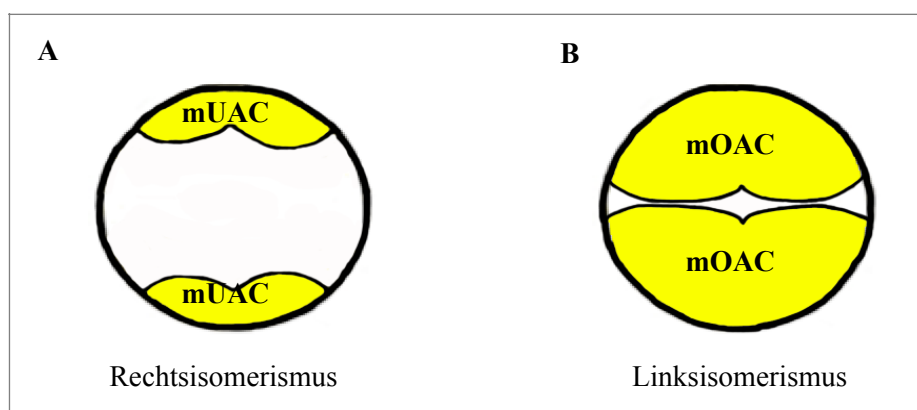


Abb. 27 Schemazeichnungen zur Illustration der postulierten morphologischen Identitäten der AV-Kissen bei Embryonen mit (A) Rechts- (B) und Links-isomerismus. mUAVC = morphologisch unteres AV-Kissen; mOAVC = morphologisch oberes AV-Kissen.

Das Auftreten von gemeinsamen AV-Kanälen bei Rechts- wie auch Linksisomerismus legt nahe, dass weder das Volumen noch die Zellzahl in den AV-Kissen allein für die Fusion verantwortlich sein könnten. Dies bietet Raum für Spekulationen über alternative Mechanismen. So könnte man sich die Fusion der AV-Kissen auch als einen Prozess vorstellen, der über zelluläre Oberflächenrezeptoren der Endothelzellen initiiert wird und nach einem Schloss-Schlüssel-Prinzip abläuft. D.h. im Normalfall könnten sich die für die Fusion verantwortlichen Oberflächenrezeptoren von oberem und unterem AV-Kissen in einer Art und Weise voneinander unterscheiden dass sie wie Schloss und Schlüssel zueinander passen. Links- und Rechts-Isomerismus hingegen ließen sich als das Vorhandensein von zwei „Schlüsseln“ bzw. von zwei „Schlössern“ interpretieren, wodurch eine Fusion der AV-Kissen in beiden Fällen nicht stattfinden könnte. Es bleibt zukünftigen Studien vorbehalten zu klären, ob ein solcher hypothetischer Mechanismus tatsächlich eine Rolle bei der Fusion der AV-Kissen spielt.

5. Zusammenfassung

Während die äußere Form von Wirbeltieren annähernd bilateral symmetrisch ist, zeigen die inneren Organe bezüglich Form und Lage Spezies-spezifische Asymmetrien entlang der Rechts-Links-Achse. Das anfänglich schlauchförmige Herz von Wirbeltierembryonen ist das erste Organ, das einen asymmetrischen Formbildungsprozess durchläuft. Dieser Prozess wird als Cardiac Looping bezeichnet. Durch ihn erhält der initial gerade und bilateral symmetrische Herzschauch eine asymmetrische, schraubig gewundene Konfiguration. Das Cardiac Looping wird als ein grundlegender Formbildungsprozess angesehen, da durch ihn die Bauelemente des embryonalen Herzens annähernd in ihre definitiven Lagebeziehungen zueinander gebracht werden. Hierdurch werden die Voraussetzungen für eine ordnungsgemäße Septierung des vierkammerigen Herzens geschaffen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Lageentwicklung des AV-Kanals des embryonalen Herzschauchs während der Phase des Cardiac Looping. Beim AV-Kanal handelt es sich um das zwischen dem primitiven Vorhof und den embryonalen Ventrikeln gelegene Bauelement des embryonalen Herzschauchs. Im AV-Kanal finden sich sog. Endokardkissen, bei denen es sich um paarige mesenchymhaltige Verdickungen des Endokards handelt. Zusammen mit der sie umgebenden Ringmuskulatur fungieren diese AV-Kissen als Sphinkteren und verhindern im klappenlosen Herzschauch den Rückfluss von Blut während der Kontraktion der embryonalen Ventrikel. Weiterhin dienen sie als Anlagen für die späteren Scheidewände und liefern Material für die späteren AV-Klappen.

Interessanterweise finden sich bei angeborenen Störungen in der Determinierung der Rechts-Links-Achse (sog. Isomerien) fast regelhaft Scheidewanddefekte im AV-Bereich. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lageänderungen des AV-Kanals während des Cardiac Looping bei höheren Wirbeltierembryonen erstmals lückenlos zu dokumentieren. Hierdurch sollte ein Beitrag zur Klärung des Zusammenhanges zwischen der Determinierung der Rechts-Links-Achse und der Entwicklung der AV-Kissen geleistet werden. Speziell sollten folgende Fragen beantwortet werden: (1.) Welche Lageänderungen erfahren die ursprünglich rechten und linken Hälften des AV-Kanals durch das Cardiac Looping? (2.) Welchen Herzfeldern können die AV-Kissen zugeordnet werden?

Für die Untersuchungen wurden Herzscläuche von normal entwickelten Hühnerembryonen der Entwicklungsstadien 11 bis 18 (nach Hamburger und Hamilton) verwendet. Zur Identifikation der Lage der ursprünglich rechten und linken Hälften des AV-Kanals wurde der endsystolische Querschnitt des Endokardschauchs als anatomische Landmarke genutzt. Dieser hat einen schlitzförmigen Querschnitt dessen Längsachse die ursprüngliche mediale Sagittalebene des Herzschauchs und damit die Grenze zwischen rechter und linker Herzhälfte markiert. In 3D-Darstellung erscheint ein komplett entleerter Endokardschauch als ein

flaches Band, dessen Ränder die ursprünglich ventrale und dorsale Mittellinie des Herzschlauchs markieren, während dessen seitliche Flächen die ursprünglich rechten und linken Hälften des Herzschlauchs repräsentieren. Um die embryonalen Herzschläuche in einen Zustand generalisierter endsystolischer Kontraktion zu bringen, wurden sie äußerlich mit hypertoner Kochsalzlösung gespült und nach Eintreten des Herzstillstandes mit einer 2%igen Glutaraldehydlösung fixiert. Von den fixierten Herzen wurden optische Gewebeschnittserien mittels Optischer Kohärenz-Tomographie (OCT) erstellt. Von repräsentativen Schnittserien wurden virtuelle 3D-Rekonstruktionen der Endokardschläuche mittels *OsiriX Imaging Software* generiert und anschließend analysiert.

Es zeigte sich, dass die mit dem Cardiac Looping einhergehenden Lageänderungen des AV-Kanals im wesentlichen aus zwei Komponenten bestehen: (1.) Einer *Schwenkung* seiner Querschnittsebene um eine transversale Achse. (2.) Einer *Torsion* um seine Seelenachse. Bei der Schwenkung wird die Querschnittsebene des AV-Kanals um eine transversale Achse „gekippt“, so dass ihre ursprünglich nach kranial gerichtete Fläche am Ende des Cardiac Loopings nach kaudal gerichtet ist. Diese Schwenkung ist die Folge der Lageänderungen der embryonalen Ventrikel, die im Rahmen des Cardiac Looping von ihrer ursprünglich kranial des Vorhofes gelegenen Position in ihre definitive Lage kaudal der Vorhöfe gelangen. Bei der Torsion des AV-Kanals wird die Ebene des schlitzförmigen endsystolischen Herzlumens von ihrer initial sagittalen Ausrichtung in eine annähernd frontale Ausrichtung verlagert. Da das Ausmaß dieser Torsion jedoch weniger als 90° beträgt wird lediglich eine Schrägstellung des endsystolischen AV-Schlitzes erreicht. Am Ende des Cardiac Looping zeigt die ursprünglich linke Seitenfläche des kontrakten AV-Endokardschlauches nach vorne und links während seine ursprünglich rechte Seitenfläche nach hinten und rechts gerichtet ist.

Aufgrund der genannten Befunde ist zu schließen, dass die aus dem linken Herzfeld stammende Hälfte des Herzschlauchs die Vorderwand sowie die linke seitliche Wand des AV-Kanals bildet, während die aus dem rechten Herzfeld stammende Hälfte die Hinterwand sowie die rechte seitliche Wand des AV-Kanals bildet. Die mit diesen Wänden verbundenen AV-Kissen dürften dementsprechend folgender Herkunft sein: (1.) vorderes (oberes) AV-Kissen - linkes Herzfeld; (2.) hinteres (unteres) AV-Kissen - rechtes Herzfeld; (3.) rechtes seitliches AV-Kissen - rechtes Herzfeld; und (4) linkes seitliches AV-Kissen - linkes Herzfeld. Die für eine normale Septierung des AV-Kanals so wichtigen oberen und unteren AV-Kissen besitzen somit eine unterschiedliche Rechts-Links-Identität. Die mögliche Bedeutung dieses Befundes für das Verständnis der normalen und gestörten Herzentwicklung wird diskutiert. Es wird vermutet, dass die beiden AV-Kissen nur dann miteinander fusionieren können, wenn sie unterschiedliche Rechts-Links-Identitäten besitzen. Das Auftreten von AV-Septumdefekten bei angeborenen Fehlbildungssyndromen mit bilateral symmetrischer Ausbildung von inneren Organen (Rechts- und Links-Isomerien) wird mit dem Vorhandensein von zwei AV-Kissen mit der gleichen Rechts-Links Identität erklärt.

5. Literatur

Abu-Issa R, Kirby ML (2007): Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 45-68

Abu-Issa R, Waldo K, Kirby ML (2004): Heart fields: one, two or more? *Dev Biol* 272, 281-285

Ackerman C, Locke AE, Feingold E, Reshey B, Espana K, Thusberg J, Mooney S, Bean LJ, Dooley KJ, Cua CL (2012): An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down-syndrome-associated atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 91, 646-659

Anderson RH, Baker EJ, Ho SY, Rigby ML, Ebels T (1991): The morphology and diagnosis of atrioventricular septal defects. *Cardiol Young* 1, 290-305

Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A (2003a): Development of the heart, Part 2. Septation of the atriums and ventricles. *Heart* 89, 949-958

Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A (2003b): Development of the heart, Part 3. Formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves and intrapericardial arterial trunks. *Heart* 89, 1110-1118

Anderson RH, Brown NA, Moorman AF (2006): Development and structures of the venous pole of the heart. *Dev Dyn* 235, 2-9

Apitz J: Lageanomalien des Herzens. Möglichkeiten des atrialen Situs. In: Apitz J (Hrsg.): Pädiatrische Kardiologie. Erkrankungen des Herzens bei Neugeborenen, Säuglingen, Kindern und Heranwachsenden. 2. Auflage; Steinkopf Verlag, Darmstadt 2002, 497

Arrechedera H, Alvarez M, Strauss M, Ayesta C (1987): Origin of mesenchymal tissue in the septum primum: a structural and ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol* 19, 641-651

Baptista MJ, Fairbrother UL, Howard CM, Farrer MJ, Davies GE, Triikka D, Maratou K, Redington A, Greve G, Njølstad PR (2000): Heterotrismy, a significant contributing factor to ventricular septal defect associated with Down syndrome? *Hum Genet* 107, 476-482

Bartram U, Molin DGM, Wisse LJ, Mohamad A, Sanford LP, Doetschman T, Speer CP, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC (2001): Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation and apoptosis in TGF- β 2-knockout mice. *Circulation* 103, 2745-2752

Beddington RSP, Robertson EJ (1999): Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96, 195-209

Blom NA, Ottenkamp J, Wenink AG, Gittenberger-de Groot AC (2003): Deficiency of the vestibular spine in atrioventricular septal defects in human fetuses with down syndrome. *Am J Cardiol* 91, 180-184

Bolender DL, Markwald RR (1979): Epithelial-mesenchymal transformation in chick atrioventricular cushion morphogenesis. *Scan Electron Microsc* 3, 313-321

Bowers PN, Brueckner M, Yost HJ (1996): Laterality disturbances. *Prog Pediatr Cardiol* 6, 53-62

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

Bremer JL (1928): Part I. An interpretation of the development of the heart. Part II. The left aorta of reptiles. *Am J Anat* 42, 307-369

Briggs L, Kakarla J, Wessels A (2012): The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion. *Differentiation* 84, 117-130

Campione M, Steinbeisser H, Schweickert A, Deissler K, van Bebber F, Lowe LA, Nowotschin S, Viebahn C, Haffter P, Kuehn MR (1999): The homeobox gene Pitx2: Mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126, 1225-1234

Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, Blum M, Franco D, Moorman AF (2001): Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: Evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol* 231, 252-264

Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ, Izpisua Belmonte J-C (2000): Mechanisms of left–right determination in vertebrates. *Cell* 101, 9-21

Casas C, Martinez S, Pritchard MA, Fuentes JJ, Nadal M, Guimera J, Arbones M, Florez J, Soriano E, Estivill X (2001): *Dscr1*, a novel endogenous inhibitor of calcineurin signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis. *Mech Dev* 101, 289-292

Castro-Quezada A, Nadal-Ginard B, de la Cruz MV (1972): Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. *J Embryol Exp Morphol* 27, 623-637

Chang C (1932): On the reaction of the endocardium to the blood stream in the embryonic heart, with special reference to the endocardial thickenings in the atrioventricular canal and the bulbus cordis. *Anat Rec* 51, 253-265

Christoffels VM, Habets PEMH, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Bruneau BG, Palmer S, Biben C (2000): Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 223, 266-278

Christoffels VM, Burch JB, Moorman AF (2004): Architectural plan for the heart: Early patterning and delineation of the chambers and nodes. *Trends Cardiovasc Med* 14, 301-307

Dalgleish AE (1976): The development of the septum primum relative to atrial septation in the mouse heart. *J Morphol* 149, 369-382

Davidson BP, Kinder SJ, Steiner K, Schoenwolf GC, Tam PP (1999): Impact of node ablation on the morphogenesis of the body axis and the lateral asymmetry of the mouse embryo during early organogenesis. *Dev Biol* 211, 11-26

Davies GE, Howard CM, Farrer MJ, Coleman MM, Bennet LB, Cullen LM, Wyse RK, Burn J, Williamson R, Kessling AM (1995): Genetic variation in the COL6A1 region is associated with congenital heart defects in trisomy 21 (Down's syndrome). *Ann Hum Genet* 59, 253-269

de la Cruz MV: Torsion and looping of the cardiac tube and primitive cardiac segments. Anatomical manifestations. In: de la Cruz MV, Markwald RR (Hrsg.): *Living Morphogenesis of the Heart*. Birkhäuser, Boston 1998, 99-119

de la Cruz MV, Sanchez-Gomez C: Straight tube heart. Primitive cardiac cavities vs. primitive cardiac segments. In: de la Cruz MV, Markwald RR (Hrsg.): Living Morphogenesis of the heart. Birkhäuser, Boston 1998, 85-98

de la Cruz MV, Giménez-Ribotta M, Saravalla O, Cayrè R (1983): The contribution of the inferior endocardial cushion of the atrioventricular canal to cardiac septation and to the development of the atrioventricular valves: study in the chick embryo. *Am J Anat* 166, 63-72

de la Cruz MV, Castillo MM, Villavicencio L, Valencia A, Moreno-Rodriguez RA (1997): Primitive interventricular septum, its primordium, and its contribution to the definitive interventricular septum: In vivo labeling study in the chick embryo heart. *Anat Rec* 247, 512-520

de Lange FJ, Moorman AF, Anderson RH, Männer J, Soufan AT, De Gier-de Vries C, Schneider MD, Webb S, van den Hoff MJ, Christoffels VM (2004): Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res* 95, 645-654

DeVries PA, Saunders JB (1962): Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. A contribution of the development of the human heart from age group IX to age group V. *Carnegie Contrib Embryol* 256, 89-114

Dominguez JN, Meilhac SM, Bland YS, Buckingham ME, Brown NA (2012): Asymmetric fate of the posterior part of the second heart field results in unexpected left/right contributions to both poles of the heart. *Circ Res* 111, 1323-1335

Drews U: Endokarkissen im AV-Kanal. In: Drews U (Hrsg.): Taschenatlas Embryologie. 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2006, 292-293

Eisenberg LM, Markwald RR (1995): Molecular regulation of atrioventricular-valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* 77, 1-6

Epstein CJ (1985): Mouse monosomies and trisomies as experimental systems for studying mammalian aneuploidy. *Trends Genet* 1, 129-134

Epstein CJ, Cox DR, Epstein LB (1985): Mouse trisomy 16. An animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann NY Acad Sci* 450, 157-168

Fakhroa KA, Choia M, Ware SM, Belmont JW, Towbin JA, Lifton RP, Khokhaa MK, Brueckner M (2011): Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning. *PNAS* 108, 2915-2920

Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JI, Neill CA, Perry LW, Hepner SI, Downing JW (1985): Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore – Washington Infant Study. *Am J Epidemiol* 121, 31-36

Ferencz C, Loffredo CA, Correa-Villasenor A, Wilson PD: The infant with congenital heart disease. Chapter 13. In: Ferencz C, Rubin JD, Loffredo CA, Magee CA (Hrsg.): Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations. *Perspectives in Pediatric Cardiology* 5. Futura, New York 1997, 337-357

Ferrara N, Gerber HP, Hesser BA, Liang XH, Camenisch G, Yang S, Lewin DA, Scheller R (2004): Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1), a novel VEGF target gene that regulates expression of inflammatory markers on activated endothelial cells. *Blood* 104, 149-158

Franco D, Campione M, Kelly R, Zammit PS, Buckingham M, Lamers WH, Moorman AF (2000): Multiple transcriptional domains with distinct left and right components in the atrial chambers of the developing heart. *Circ Res* 87, 984-991

Franco D, Kelly R, Moorman AF, Lamers WH, Buckingham M, Brown NA (2001): MLC3F transgene expression in iv-mutant mice reveals the importance of left-right signalling pathways for the acquisition of left and right atrial but not ventricular compartment identity. *Dev Dyn* 221, 206-215

Franco D, Campione M (2003): The role of Pitx2 during cardiac development: Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med* 13, 157-163

Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X (1995): A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* 4, 1935-1944

Furtado MB, Solloway MJ, Jones VJ, Costa MW, Biben C, Wolstein O, Preis JI, Sparrow DB, Saga Y, Dunwoodie SL (2008): BMP/SMAD1 signaling sets a threshold for the left/right pathway in lateral plate mesoderm and limits availability of SMAD4. *Genes Dev* 22, 3037-3049

Furtado MB, Biben C, Shiratori H, Hamada H, Harvey RP (2011): Characterization of Pitx2c expression in the mouse heart using a reporter transgene. *Dev Dyn* 240, 195-203

Gage PJ, Suh H, Camper SA (1999): Dosage requirement of Pitx2c for development of multiple organs. *Development* 126, 4643-4651

Gearhart JD, Davisson MT, Oster-Granite, ML (1986): Autosomal aneuploidy in mice: Generation and developmental consequences. *Brain Res Bull* 16, 789-801

Gittenberger-de Groot AC, Bartram U, Oosthoek PW, Bartelings MM, Hogers B, Poelmann RE, Jongewaard IN, Klewer SE (2003): Collagen type VI expression during cardiac development and in human fetuses with trisomy 21. *The Anatomical Record Part A* 275, 1109-1116

Goddeeris MM, Rho S, Petiet A, Davenport CL, Johnson GA, Meyers, EN, Klingensmith J (2008): Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart. *Development* 135, 1887-1895

Goor DA, Lillehei LW: Congenital malformations of the heart. Embryology, anatomy and operative considerations. Grune und Stratton, New York 1975, 80-100

Gormley JP, Nascone-Yoder NM (2003): Left and right contributions to the *Xenopus* heart: Implications for asymmetric morphogenesis. *Dev Genes Evol* 213, 390-398

Hamada H, Meno C, Saijoh Y, Adachi H, Yashiro K, Sakuma R, Shiratori H (2001): Role of asymmetric signals in left-right patterning in the mouse. *Am J Med Genet* 101, 324-327

Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y (2002): Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 3, 103-113

Harvey RP (1998): Cardiac Looping: an uneasy deal with laterality. *Semin Cell Dev Biol* 9, 101-108

Harvey RP (2002): Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* 3, 544-556

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

Hesser BA, Liang X, Camenisch G, Yang S, Lewin DA, Scheller R, Ferrara N, Gerber HP (2004): Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1), a novel VEGF target gene that regulates expression of inflammatory markers on activated endothelial cells. *Blood* 104, 149-158

Hiltgen GG, Markwald RR, Litke LL (1996): Morphogenetic alterations during endocardial cushion development in the trisomy 16 (Down syndrome) mouse. *Pediatr Cardiol* 17, 21-30

Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S (2006): Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125, 33-45

His W: Die Area interposita, die Eustachische Klappe und die Spina vestibuli. In: His W (Hrsg.): *Anatomie menschlicher Embryonen*. Band 2; Vogel, Leipzig 1880, 149-152

Hoffman JI (1990): Congenital heart disease: incidence and inheritance. *Pediatr Clin North Am* 37, 25-43

Hoffman JI, Kaplan S (2002): The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 39, 1890-1900

Icardo JM (1996): Developmental biology of the vertebrate heart. *J Exp Zool* 275, 144-161

Icardo JM, Arrechedera H, Colvee E: Atrioventricular endocardial cushions in the pathogenesis of common atrioventricular canal: morphological study in the iv/iv mouse. In: Clark EB, Markwald RR, Takao A (Hrsg.): *Developmental Mechanisms of heart disease*. Futura, New York 1995, 529-544

Igarashi H (1984): Scanning electron microscopy study on the formation of the atrial septum in rat embryos. *Acta Anat Nippon* 59, 28-46

Kallfelz HC (1999): Das Kind wird zum Erwachsenen. Entwicklung von Diagnostik und Behandlung angeborener Herzfehler während der letzten Jahrzehnte und ihre Bedeutung für die Erwachsenenherzkardiologie. *Herz* 24, 259-262

Kawahito S, Kitahata H, Tanaka K, Nozaki J, Oshita S (2003): Intraoperative transoesophageal echocardiography in a low birth weight neonate with atrioventricular septal defect. *Paediatr Anaesth* 13, 735-738

Keller BB, Tinney JP, Hu N (1994): Embryonic ventricular diastolic and systolic pressure-volume relations. *Cardiol Young* 4, 19-27

Kelly RG, Buckingham ME (2002): The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends in Genetics* 18, 210–216

Kim JS, Viragh S, Moorman AF, Anderson RH, Lamers WH (2001): Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart. *Circ Res* 88, 395-402

Kinsella MG, Fitzharris TP (1980): Origin of cushion tissue in the developing chick heart: cinematographic recordings of in situ formation. *Science* 207, 1358-1360

Kirby ML: Cardiogenic fields and heart tube formation. In: Kirby ML (Hrsg.). *Cardiac Development*. 1. Auflage. Oxford University Press, New York/Oxford 2007, 21-35

Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, Katoh-Fukui Y, Suzuki R, Ohuchi H, Suehiro A, Motegi Y, Nakahara Y (1999): Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* 126, 5749-5758

Klewer SE, Krob SL, Kolker SJ, Kitten GT (1998): Expression of type VI collagen in the developing mouse heart. *Dev Dyn* 211, 248-255

Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, Grubert F, Erdman C, Gao MC, Lange K (2009): The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12031-12036

Korenberg JR, Kawashima H, Pulst SM, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, Schonberg SA, West R, Allen L, Magenis E (1990): Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Human Genet* 47, 236-246

Korenberg JR, Bradley C, Distèche CM (1992): Down syndrome: Molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Human Genet* 50, 294-302

Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Distèche C (1994): Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci* 91, 4997-5001

Kruithof BP, Krawitz SA, Gaussin V (2007): Atrioventricular valve development during late embryonic and postnatal stages involves condensation and extracellular matrix remodelling. *Dev Bio* 302, 208-217

Lamers WH, Viràgh S, Wessels A, Moorman AFM, Anderson RH (1995): Formation of the tricuspid valve in the human heart. *Circulation* 91, 111-121

Lamers WH, Moorman AF (2002): Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ Res* 91, 93-103

Lamers WH, Wessels A, Verbeek FJ, Moorman AF, Viragh S, Wenink AC, Gittenberger-de Groot AC, Anderson RH (1992): New findings concerning ventricular septation in the human heart. Implications for maldevelopment. *Circulation* 86, 1194-1205

Layton WM, Manasek FJ: Cardiac Looping in early iv/iv mouse embryos. In: Van Praagh R, Toao A (Hrsg.): *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. Futura, New York 1980, 109-126

Levin M (2005): Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mechanisms of Development* 122, 3-25

Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin CA (1995): Molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82, 803-814

Lewis FT, Abbott ME (1915): Reversed torsion of the human heart. *Anat Rec* 9, 103-105

Lewis FT, Abbott ME (1916): Reversed torsion of the ventricular bend of the embryonic heart in the explanation of certain forms of cardiac anomaly. *Bull Int Assoc Med Mus* 6, 111

Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfelt MG (1999): Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401, 279-282

Lincoln J, Alfieri CM, Yutzey KE (2004): Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Dev Dyn* 230, 239-250

Liu C, Liu W, Lu MF, Brown NA, Martin, JF (2001): Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* 128, 2039-2048

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

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

Lowe LA, Supp DM, Sampath K, Yokoyama T, Wright CV, Potter SS, Overbeek P, Kuehn MR (1996): Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* 381, 158-161

Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF (1999): Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 401, 276 278

Lyon MF, Kirby MC (1995): Mouse chromosome atlas. *Mouse Genome* 93, 23-66

Männer J, Seidl W, Steding G (1993): Correlation between the embryonic head flexures and cardiac development. An experimental study in chick embryos. *Anat Embryo Berl* 188, 269-285

Männer J (2000): Cardiac Looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biochemical aspects of looping process. *Anat Rec* 259, 248-262

Männer J (2009): The anatomy of Cardiac Looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations. *Clin Anat* 22, 21-35

Männer J, Thrane L, Norozi K, Yelbuz TM (2008): High-resolution in vivo imaging of the cross-sectional deformations of contracting embryonic heart loops using optical coherence tomography. *Dev Dyn* 237, 953-961

Männer J, Thrane L, Norozi K, Yelbuz TM (2009): In vivo imaging of the cyclic changes in cross-sectional shape of the ventricular segment of pulsating embryonic chick hearts at stages 14 to 17: A Contribution to the Understanding of the Ontogenesis of Cardiac Pumping Function. *Dev Dyn* 238, 3273-3284

Männer J (2013): On the form problem of embryonic heart loops, its geometrical solutions, and a new biophysical concept of cardiac looping. *Ann Anat* 195, 312-323

Marino B (1993): Congenital heart disease in patients with Down's syndrome: anatomic and genetic aspects. *Biomed Pharmacother* 47, 197-200

Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ (1977): Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat* 148, 85-120

Markwald RR (1995): Overview: Formation and early morphogenesis of the primary heart tube. In: Clark EB, Markwald RR, Takao A (Hrsg.): *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. Futura, New York 1995, 3-27

Maslen CL (2004): Molecular genetics of atrioventricular septal defects. *Curr Opin Cardiol* 19, 205-210

McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003): Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114, 61-73

Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M, Toyoda Y, Hamada H (1996): Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* 381, 151-155

Meno C, Ito Y, Saijoh Y, Matsuda Y, Tashiro K, Kuhara S, Hamada H (1997): Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: Their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* 2, 513-524

Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, Noji S, Kondoh H, Hamada H (1998): *Lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* 94, 287-297

Miyabara S: Cardiovascular malformations of mouse trisomy 16: Pathogenetic evaluation as an animal model for human trisomy 21. In: Clark EB, Takao A (Hrsg.): *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*. Futura, New York 1990, 409-430

Moorman AF, Soufan AT, Hagoort J, de Boer PA, Christoffels VM (2004): Development of the building plan of the heart. *Ann NY Acad Sci* 1015, 171-181

Moorman AF, Christoffels VM, Anderson RH, van den Hoff MJ (2007): The heart-forming fields: One or multiple? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1257-1265

Moreno-Rodriguez RA, De la Cruz MV, Krug EL (1997): Temporal and spatial asymmetries in the initial distribution of mesenchyme cells in the atrioventricular canal cushions of the developing chick heart. *Anat Rec* 248, 84-92

Müller W, Hassel M: Positionsinformation, Musterbildung II: Embryonale Induktion und Musterbildung durch Zell-Zell-Kommunikation. In: Müller W, Hassel M (Hrsg.): *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie*. 5. Auflage; Springer, Heidelberg 2012, 247-291

Nadeau J (1989): Maps of linkage and synteny homologies between mouse and man. *Trends Genet* 19, 582-586

Nakajima Y, Yamagishi T, Horaki S, Nakamura A (2000): Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of Transforming Growth Factor (TGF)- β and Bone Morphogenetic Protein (BMP). *Anat Rec* 258, 119-127

Nakaya M, Biris K, Tsukiyama T, Jaime S, Rawls JA, Yamaguchi TP (2005): Wnt3a links left right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation; *Development* 132, 5425-5436

Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N (1998): Randomization of left-right asymmetry due the loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829-837

Nowotschin S, Liao J, Gage PJ, Epstein JA, Campione M, Morrow BE (2006): Tbx1 affects asymmetric cardiac morphogenesis by regulating Pitx2 in the secondary heart field. *Development* 133, 1565-1573

Nugent EW, Plauth WH, Edwards JE, Williams WH: The Pathology, Pathophysiology, Recognition and Treatment of Congenital Heart Disease. In: Schlant RC, Alexander RW (Hrsg.): Hurst's The Heart. 8. Auflage; McGraw-Hill, New York 1994; 1761-1854

Oosthoek PW, Wenink ACG, Vrolijk BCM, Wisse LJ, DeRuiter MC, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC (1998): Development of the atrioventricular tension apparatus in the human heart. *Anat Embryol* 198, 317-329

Pagan-Westphal SM, Tabin CJ (1998): The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* 93, 25-35

Patten BM (1922): The formation of the cardiac loop in the chick. *Am J Anat* 30, 373-397

Patten BM, Kramer TC, Barry A (1948): Valvular action in the embryonic chick heart by localized apposition of endocardial masses. *Anat Rec* 102, 299-311

Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B (2002): The ion channel Polycystin 2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* 12, 938-943

Pernkopf E, Wirtinger W (1933): Die Transposition der Herzostien - ein Versuch der Erklärung dieser Erscheinung. I. Teil: Die Phoronomie der Herzentwicklung als morphogenetische Grundlage der Erklärung. *Z Anat Entw Gesch* 100, 561-711

Pexieder T, Miyabara S, Gropp A: Congenital heart disease in experimental (fetal) mouse trisomies: Incidence. In: Pexieder T (editor): Perspectives in Cardiovascular Research, Vol 5: Mechanism of Cardiac Morphogenesis and Teratogenesis. Raven Press, New York 1981, 389-399

Pierpont ME, Markwald RR, Lin AE (2000): Genetic aspects of atrioventricular septal defects. *Am J Med Genet* 97, 289-296

Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, Shen J, Manichaikul A, Tomita-Mitchell A, Boardman K, Briggs C, Garg V, Srivastava D (2007): Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Cardiol* 43, 677-685

Ramsdell AF (2005): Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: getting to the heart of the matter in vertebrate left right axis determination. *Dev Biol* 288, 1-20

Ramsdell AF, Bernanke JM, Johnson J, Trusk TC (2005): Left-right lineage analysis of AV cushion tissue in normal and laterality defective *Xenopus* hearts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287, 1176-1182

Ramsdell AF, Bernanke JM, Trusk TC (2006): Left-right lineage analysis of the embryonic *Xenopus* heart reveals a novel framework linking congenital cardiac defects and laterality disease. *Development* 133, 1399-1410

Rana MS, Horsten NC, Tesink-Taekema S, Lamers WH, Moorman AF, van den Hoff MJ (2007): Trabeculated right ventricular free wall in the chicken heart forms by ventricularization of the myocardium initially forming the outflow tract. *Circ Res* 100, 1000-1007

Reeves RH, Gearhart JD, Littlefield JW (1986): Genetic basis for a mouse model of Down syndrome. *Brain Res Bull* 16, 803-814

Rehder H (1981): Pathology of trisomy 21 with particular reference to persistent common atrioventricular canal of the heart. *Hum Genet Suppl.* 2, 57-73

Restivo A, Piacentini G, Placidi S, Saffirio C, Marino B (2006): Cardiac outflow tract: A review of some embryogenetic aspects of the conotruncal region of the heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288, 936-943

Rongish BJ, Drake CJ, Argraves WS, Little CD (1998): Identification of the developmental marker, JB3-antigen, as Fibrillin-2 and its de novo organization into embryonic microfibrillar arrays. *Dev Dyn* 212, 461-471

Rosenquist GC, DeHaan RL (1966): Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. *Carnegie Inst. of Washington, Contrib Embryol* 38, 111-121

Rothenberg F, Fisher SA, Watanabe M (2003): Sculpting the cardiac outflow tract. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 38-45

Sadler TW (2008): Herz und Gefäße. Entwicklung und Lage des Herzschauches. In: Sadler TW (Hrsg.): *Lehrbuch Medizinische Embryologie*. 11. Auflage; Thieme, Stuttgart 2008, 221-247

Samanek M, Slavik Z, Krejcir M (1991): Seasonal differences in the incidence of congenital heart defects. *Czech Med* 14, 146-155

Schroeder JA, Jackson LF, Lee DC, Camenisch TD (2003): Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. *J Mol Med* 81, 392-403

Sharratt GP, Webb S, Anderson RH (2003): The vestibular defect: an interatrial communication due to a deficiency in the atrial septal component derived from the vestibular spine. *Cardio Young* 13, 184-190

Shiratori H, Yashiro K, Shen MM, Hamada H (2006): Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. *Development* 133, 3015-3025

Sissman NJ (1970): Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: Comparative chronology. *Am J Cardiol* 25, 141-148

Smith SM, Dickman ED, Thompson RP, Sinning AR, Wunsch AM, Markwald RR (1997): Retinoic acid directs cardiac laterality and the expression of early markers of precardiac asymmetry. *Dev Biol* 182, 162-171

Snarr BS, O'Neal JL, Chintalapudi MR, Wirrig EE, Phelps EL, Kubalak SW, Wessels A (2007a): Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development. *Circ Res* 101, 971-974

Snarr BS, Wirrig EE, Phelps AL, Trusk TC, Wessels A (2007b): A spatiotemporal evaluation of the contribution of the dorsal mesenchymal protrusion to cardiac development. *Dev Dyn* 236, 1287-1294

Snarr BS, Kern CB, Wessels A (2008): Origin and Fate of Cardiac Mesenchyme. *Dev Dyn* 237, 2804-2819

Steding G, Seidl W: Pathogenesis of congenital heart disease. In: Nora JJ, Takao R (Hrsg.): *Congenital Heart Disease: Causes and Processes*. Futura, New York 1984, 501-512

Taber LA, Voronov DA, Ramasubramanian A (2010): The role of mechanical forces in the torsional component of Cardiac Looping. *Ann NY Acad Sci* 1188, 103-110

Tasaka H, Krug EL, Markwald RR (1996): Origin of the pulmonary venous orifice in the mouse and its relation to the morphogenesis of the sinus venosus, extracardiac mesenchyme (spina vestibuli) and atrium. *Anat Rec* 246, 107-113

Tomita H, Connuck DM, Leatherbury L, Kirby ML (1991): Relation of early hemodynamic changes to final cardiac phenotype and survival after neural crest ablation in chick embryos. *Circulation* 84, 1289-1295

Van Mierop LHS: Pathology and pathogenesis of endocardial cushion defects. Surgical implications. In: Davila JC (editor): Second Henry Ford Hospital International Symposium on Cardiac Surgery. Appleton-Century-Crofts, New York 1977, 201-207

Van Mierop LHS, Alley RD, Kansel HW, Stranahan A (1962): The anatomy and embryology of endocardial cushion defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 43, 71-83

Van Praagh R (1972): The segmental approach to diagnosis in congenital heart disease. *Birth Defects Orig Artic Ser* 8, 4-23

Van Praagh R, Van Praagh S (1966): Isolated ventricular inversion. A consideration of the morphogenesis, definition and diagnosis of nontransposed and transposed great arteries. *Am J Cardiol* 17, 395-406

Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN (2003): Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 100, 669-674

Wagner M, Siddiqui MAQ (2007): Signal transduction in early heart development (I): Cardiogenic induction and heart tube formation. *Exp Biol Med* 232, 852-865

Warkany J, Passarge E, Smith LB (1966): Congenital malformations in autosomal trisomy syndromes. *Am J Dis Child* 112, 502-517

Webb S, Anderson RH, Brown NA (1996): Endocardial cushion development and heart loop architecture in the trisomy 16 mouse. *Dev Dynamics* 206, 301-309

Webb S, Brown NA, Anderson RH (1997): Cardiac morphology at late fetal stages in the mouse with trisomy 16: consequences for different formation of the atrioventricular junction when compared to humans with trisomy 21. *Cardiovasc Res* 34, 515-524

Webb S, Anderson RH, Lamers WH, Brown NA (1999): Mechanisms of deficient cardiac septation in the mouse with trisomy 16. *Circ Res* 84, 897-905

Weijerman ME, van Furth AM, van der Mooren MD, van Weissenbruch MM, Rammeloo L, Broers CJ, Gemke RJ (2010): Prevalence of congenital heart defects and persistent pulmonary hypertension of the neonate with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 169, 1195-1199

Weninger (2005): *Cited2* is required both for heart morphogenesis and establishment of the left-right axis in mouse development. *Development* 132, 1337-1348

Wenink ACG (1974): The formation of the septum membranaceum in the human heart. *Bull Ass Anat* 58, 1127-1132

Wenink ACG (1992): Quantitative morphology of the embryonic heart: an approach to development of the atrioventricular valve. *Anat Rec* 234, 129-135

Wenink ACG, Gittenberger-de Groot AC (1985): The role of atrioventricular endocardial cushions in the the septation of the heart. *Int J Cardiol* 8, 25-44

Wessels A, Sedmera D (2003): Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics* 15, 165-176

Wessels A, Markman MW, Vermeulen JL, Anderson RH, Morman AF, Lamers WH (1996): The development of the atrioventricular junction in the human heart. *Circ Res* 78, 110-117

Wessels A, Anderson RH, Markwald RR, Webb S, Brown NA, Viragh S, Moorman AF, Lamers WH (2000): Atrial development in the human heart: a immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues. *Anat Rec* 259, 288-300

Wienecke MM, Thompson RP, Germroth PG: Asymmetry of the inferior and superior atrioventricular endocardial cushions. In: Clark EB, Markwald RR, Takao A (Hrsg.): *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. Futura, New York 1995, 309-314

Wilting J, Männer J: Development and patterning of the cardiac lymphatic network. In: Karunamuni G (editor): *The Cardiac Lymphatic System: An Overview*. Springer, New York, 2013, 17-31

Wirrig E, Snarr BS, Chintalapudi MR, O'Neal JL, Phelps AL, Barth JL, Fresco VM, Kern CB, Mjaatvedt CH, Toole BP (2007): Cartilage link protein 1 (Crtl1), an extracellular matrix component, playing an important role in heart development. *Dev Biol* 310, 291-303

Wirtinger W (1937): Die Analyse der Wachstumsbewegungen und der Septierung des Herzschlauches. *Anat Anz* 84, 33-79

Wunsch AM, Little CD, Markwald RR (1994): Cardiac endothelial heterogeneity defines valvular development as demonstrated by the diverse expression of JB3, an antigen of the endocardial cushion. *Dev Biol* 165, 585-601

Yasui H, Morishima M, Nakazawa M, Aikawa E (1998): Anomalous looping, atrioventricular cushion dysplasia, and unilateral ventricular hypoplasia in the mouse embryo with right isomerism induced by retinoic acid. *Anat Rec* 250, 210-219

Yoshioka H, Meno C, Koshihara K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina EV, Murray JC (1998) : Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94, 299-305

Yost HJ (2001): Establishment of left-right asymmetry. *Int Rev Cytol* 203, 357-381

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders meinen Eltern, die mir im Verlauf meines Medizinstudiums jederzeit hilfreich zur Seite standen. Ohne eine so großartige Unterstützung hätte ich vermutlich nicht den Schritt zu der anschließenden Doktorarbeit gewagt.

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

Herrn Hannes Sydow möchte ich für die freundschaftliche und immer sehr unterhaltsame Arbeitsatmosphäre danken.

Lebenslauf

Ich wurde am 27. September 1980 in Marienberg geboren und bin ledig.

Im Zeitraum vom September 1998 bis zum August 2001 absolvierte ich einen Ausbildungsabschnitt im Gesundheitswesen, den ich mit der Prüfung zum examinierten Krankenpfleger abschloss.

Von September 2001 bis Juli 2004 besuchte ich das Abendgymnasium Chemnitz, welches ich mit dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife beendete.

Dem schloss sich im Sommersemester 2005 der Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen an, das ich nach Bestehen des Staatsexamens im Oktober 2012 mit dem Erhalt der Approbation abschloss.

Im März 2011 begann ich die Dissertation mit dem Titel „ Cardiac Looping und die frühe Topogenese der AV-Region: Untersuchung an Hühnerembryonen “ im Institut für Anatomie in der Abteilung Anatomie und Embryologie der Georg-August-Universität Göttingen unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. med. J. Männer.