

**Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

Neue Erkenntnisse der Embryologie zur Entwicklung des Herzens.  
Eine Literaturstudie

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin an der  
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von  
Katrín Borasch  
Tierärztin  
aus Demmin

Berlin 2019

**Journal-Nr.: 4098**



Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
**der Freien Universität Berlin**

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
<b>Erster Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
<b>Zweiter Gutachter:</b>	Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz
<b>Dritter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): heart, embryology, embryonal development,  
embryogenesis, vertebrates, man, animals, literature reviews

**Tag der Promotion:** 23.04.2019



Meinen Kindern

„Theory without facts is fantasy, but facts without theory is chaos“  
Charles Otis Whitman  
(amerikanischer Zoologe, 1842-1910)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	3
2.1	Quellen und Arten der Literatur .....	3
2.2	Literaturrecherche .....	3
2.3	Auswahlkriterien für verwendete Literatur .....	4
2.4	Verarbeitung und Darstellung der ausgewählten Literatur .....	5
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	7
3.1.	Ursprung der Herzzellen - von den kardiogenen Progenitoren der Blastula bis zum geraden Herzschlauch des Embryos .....	7
3.1.1	Bisheriger Wissensstand und überholte Ansichten .....	7
3.1.2	Ursprung der kardiogenen Precursoren .....	9
3.1.2.1	Aufbau des Embryos vor der Gastrulation .....	9
3.1.2.2	Induktion der kardiogenen Progenitoren im posterioren Epiblast .....	10
3.1.2.3	Prä-Spezifikation kardiogener Progenitoren im Primitivstreifen .....	12
3.1.3	Etablierung des kardiogenen Mesoderms .....	14
3.1.3.1	Spezifikation der prospektiven Herzzellen .....	14
3.1.3.2	Etablierung des perikardialen Zöloms .....	16
3.1.4	Determinierung* im kardiogenen Mesoderm .....	17
3.1.5	Musterbildung* innerhalb des kardiogenen Mesoderms .....	18
3.1.5.1	Lokalisation der unterschiedlichen Herzfelder .....	18
3.1.5.2	Genexpressionsmuster in den Herzfeldern .....	20
3.1.5.3	Klonale Analyse der Herzfelder .....	21
3.1.6	Entstehung des geraden Herzschlauchs und Differenzierung* der Kardiomyozyten .....	21
3.1.7	Entstehung des Endokards .....	26
3.2	Herzschleifenbildung .....	29
3.2.1	Grundlegendes Wissen und veraltete Vorstellungen .....	29
3.2.2	Auf dem Weg zur Asymmetrie .....	30
3.2.2.1	Links-rechts-Asymmetrie .....	30
3.2.2.2	Ausbildung der antero-posterioren Identität des Herzens .....	33
3.2.2.3	Dorso-ventrale Musterbildung des Herzschlauchs .....	34
3.2.3	Phasen der Herzschleifenbildung .....	35
3.2.4	Morphogenese und Ursachen/Mechanismen .....	36
3.2.4.1	C-Looping .....	36
3.2.4.2	Frühes S-Looping .....	38
3.2.4.3	Spätes S-Looping .....	39
3.2.5	Herausbildung der Herzkammern während des Loopings .....	41
3.2.5.1	Arten des Myokards .....	41
3.2.5.2	Expansion der Herzkammern und Remodellierung der inneren Kurvatur .....	41
3.2.5.3	Segment- versus Ballontheorie .....	43
3.2.6	Entstehung und Rolle des Epikards .....	44
3.3	Die Septierung des Herzens .....	48
3.3.1	Bekanntes Wissen und obsolete Ansätze .....	48
3.3.2	Regionale transkriptionale Programme .....	49
3.3.2.1	Kammer-spezifische Genexpression .....	49
3.3.2.2	Genexpressionsmuster im Nicht-Kammer-Myokard .....	52
3.3.3	Valvulogenese .....	53
3.3.3.1	Entstehung der Atrioventrikularklappen .....	53
3.3.3.2	Entstehung der Semilunarklappen .....	60
3.3.4	Septierung der Vor- und Hauptkammern .....	63

3.3.4.1	Entstehung des Septum interatriale .....	63
3.3.4.2	Bildung des Septum interventriculare.....	65
3.4	Die weitere Entwicklung des arteriellen Herzpols .....	68
3.4.1	Gültige Erkenntnisse und kontroverse Anschauungen .....	68
3.4.2	Regulatorische Netzwerke im Zweiten Herzfeld mit Bedeutung für die Entwicklung des Ausflusstrakts.....	69
3.4.3	Die Separierung des Ausflusstrakts .....	71
3.4.3.1	Entwicklung der Kiemenbogenarterien .....	71
3.4.3.2	Septierung des Ausflusstrakts und Entstehung der Gefäßwände von Aorta und Truncus pulmonalis .....	73
3.4.3.3	Molekulare und physikalische Mechanismen der Remodellierung des Ausflusstrakts.....	76
3.4.4	Kardiale Neuralleistenzellen und die Ausflusstraktseptierung.....	78
3.4.4.1	Herkunft und Induktion kardialer Neuralleistenzellen .....	78
3.4.4.2	Migration der Neuralleistenzellen und ihre Regulation.....	80
3.4.4.3	Beitrag zur Ausflusstraktseparierung.....	81
3.5.	Die Morphogenese des venösen Herzpols .....	82
3.5.1	Etablierte Grundlagen und widerlegte Annahmen.....	82
3.5.2	Entstehung der systemischen venösen Zuflüsse zum Herzen .....	82
3.5.2.1	Ursprung und Remodellierung der Sinus venosus-Region .....	82
3.5.2.2	Transkriptionale Regulation im Sinus venosus .....	84
3.5.3	Entwicklung der Vena pulmonalis.....	86
3.5.3.1	Entstehung des Pulmonalvenenendothels .....	86
3.5.3.2	Genese und Regulation des Myokards der Vena pulmonalis.....	86
3.5.3.3	Lateralität der Vena pulmonalis .....	87
3.5.4	Die morphogenetisch-topographische und genetische Beziehung zwischen Vena pulmonalis und Sinus venosus.....	87
3.6	Die Entwicklung der Koronargefäße .....	90
3.6.1	Anerkanntes Wissen und veraltete Theorien.....	90
3.6.2	Entstehung des Epikards - eine kurze Rekapitulation.....	91
3.6.3	Epikardiale epithelio-mesenchymale Transition und ihre Regulation.....	91
3.6.4.1	Herkunft der koronaren Endothelzellen.....	94
3.6.4.2	Entstehung und Ausbreitung vaskulärer Plexus .....	94
3.6.4.3	Regulation von Vaskulogenese und Angiogenese.....	95
3.6.4.4	Etablierung der arteriellen vs. venösen Identität der Endothelzellen .....	97
3.6.5	Bildung der koronaren Gefäßwände .....	98
3.6.5.1	Herkunft und Rekrutierung glatter Muskelzellen für die Koronargefäße.....	98
3.6.5.2	Differenzierung der „epicardium-derived cells“ .....	99
3.6.5.2	Bedeutung perivaskulärer und interstitieller Fibroblasten .....	99
3.7.	Entstehung des kardialen Erregungsleitungssystems .....	100
3.7.1	Bewährte Erkenntnisse und veraltete Ansichten .....	100
3.7.2	Eigenschaften und Herkunft der Zellen des Erregungsleitungssystems .....	101
3.7.2.1	Charakteristika und Diversifikation von erregungsleitendem Myokard und Arbeitsmyokard.....	101
3.7.2.2	Induktion des kardialen Erregungsleitungssystems.....	103
3.7.3	Entstehung des Sinusknotens.....	104
3.7.3.1	Schrittmacheraktivität im primären Herzschlauch .....	104
3.7.3.2	Morphogenese des Sinusknotens und ihre Regulation .....	104
3.7.3.3	Aufbau des Sinusknotens .....	106
3.7.3.4	Mechanismen der Schrittmacheraktivität.....	106
3.7.4	Entwicklung des Atrioventrikularknotens.....	108
3.7.4.1	Morphogenese und transkriptionales Profil .....	108

3.7.4.2	Entstehung und Bedeutung der Atrioventrikulären Isolation.....	109
3.7.5	Etablierung des ventrikulären Erregungsleitungssystems.....	110
3.7.5.1	Allgemeines zu Aufbau, Eigenschaften und Herkunft .....	110
3.7.5.2	Morphogenese und Regulation des ventrikulären Erregungsleitungs- systems.....	111
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	113
4.1	Bedeutung der Kardiogenese und Zielsetzung .....	113
4.2	Material, Methoden und Limitationen .....	114
4.3	Die Herkunft der kardiogenen Progenitorzellen.....	116
4.4	Theorie der Herzfelder- zwei, drei oder doch nur eins? .....	119
4.5	Asymmetrische Organogenese und Tücken bei der Visualisierung komplexer dreidimensionaler Prozesse .....	122
4.5.1	Grundlagen der Links-rechts-Asymmetrie .....	122
4.5.2	Bildung des geraden Herzschlauchs .....	123
4.5.3	Looping .....	123
4.6	Trennung von Körper- und Lungenzirkulation .....	126
4.6.1	Separierung von Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt und Entstehung der assoziierten Herzklappen.....	126
4.6.2	Entstehung der Vorkammer- und Hauptkammersepten.....	127
4.7	Remodellierung des venösen Herzpols .....	129
4.8	Rekrutierung oder Präspezifikation? Der Ursprung des Erregungs- leitungssystems .....	130
4.9	Ausblick .....	131
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	132
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	135
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	138
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	141
<b>9.</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	223
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> .....	224
<b>11.</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	225



# 1. Einleitung

Das Herz ist das erste funktionale Organ im Vertebratenembryo, denn der stetig steigende Sauerstoff- und Nährstoffbedarf des wachsenden Embryos kann nur kurze Zeit durch Diffusion gedeckt werden und erfordert die Entwicklung eines spezialisierten zirkulatorischen Systems, des Herz-Kreislauf-Systems (Proctor und Lynch, 1993; Rüsse und Sinowatz, 1998; Sedmera, 2011).

Das komplexe Herz von Vögeln und Säugern entwickelte sich aus dem primitiven, linearen „Pumporgan“ primitiver Wirbeltier-Vorläufer wie dem Lanzettfischchen (Romer und Parsons, 1986). Tatsächlich deutet nicht nur die tiefe Konservierung transkriptionaler Netzwerke der Kardiogenese über große phylogenetische Distanzen hinweg bis hin zur Taufliede, sondern auch die morphologischen Parallelen zwischen spezifischen, embryonalen Stadien der Kardiogenese bei Säugern und Vögeln und den definitiven Herzen niederer Wirbeltiere bzw. Insekten auf einen gemeinsamen Ursprung dieses Organs hin (Bodmer, 1995; Lyons et al., 1995; Fu et al., 1998; Farmer, 1999; Zaffran und Frasch, 2002; Holland et al., 2003; Davidson, 2007; Xavier-Neto et al., 2007; Bodmer und Frasch, 2010). Die hohe Komplexität des Herzens bei Vogel und Säugetier resultiert aus der Anpassung an erhöhte Aktivität und damit verbundene gesteigerte Nährstoff- und Sauerstoffutilisation der Gewebe (Proctor und Lynch, 1993).

Das Herz der endothermen Wirbeltiere besteht aus den drei Schichten Endokard (innere Auskleidung), Myokard (Muskelschicht) und Epikard (äußere Umhüllung), die sich nach der Gastrulation aus der kardiogenen Domäne des Mesoderms (mittleres Keimblatt) generieren (Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Linask und Lash, 1993). Nach der Bildung des primitiven geraden Herzschauchs im Zuge der Abfaltung der embryonalen Keimscheibe stellen Herzscheitelformung, Expansion des Kammermyokards, Entwicklung des Reizgenerierungs- und Reizleitungssystems, Septierung und Herzklappenbildung die Weichen für Konfiguration und Funktion des reifen Herzens.

Das immense Interesse an der Erforschung der Kardiogenese begründet sich darauf, dass angeborene Herzkrankheiten mit zu den Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei Mensch und Tier in den Industrieländern zählen (Kemler und Martin, 1972; Cottrill und Rosedale, 1992; Roger et al., 2012; Van der Linde et al., 2011; Schrope, 2015; Shi et al., 2016).

Eine Elimination hereditärer sowie umweltbedingter Störfaktoren der Embryonalentwicklung des Herzens setzt ein nahezu lückenloses Wissen über die genetischen und physikalischen Regulationsmechanismen im gesunden Organismus voraus.

Die Entdeckung, dass embryonale regulatorische Genkaskaden nach Verletzung und bei der Gewebsregeneration im Herzen reexprimiert werden, eröffnete der Stammzell-basierten regenerativen Herztherapie eine Vielfalt an Optionen, die bis heute Gegenstand intensiver Forschung sind (Linke et al., 2005; Takahashi et al., 2007; Zhao et al., 2015; Li et al., 2015; Jiang et al., 2016; Xu et al., 2016).

Seit Beginn der systematischen Erforschung der Kardiogenese Ende des 19. Jahrhunderts hat sich durch kontinuierlich verbesserte technische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden ein Quantensprung an Erkenntnisgewinn vollzogen. Dieser hat sich jedoch nur unzureichend in den Inhalten gängiger veterinärmedizinischer Lehrbücher niedergeschlagen. Auf der anderen Seite sind nach wie vor viele Fragen zur Kardiogenese offen.

Konkret sind folgende Defizite bei der Rezeption der vorhandenen Literatur zutage getreten: (1) Auch in aktuelleren Lehrwerken werden lang als überholt geltende Paradigmen vertreten. Das Wissen über beteiligte Gene, Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle wird, wenn überhaupt, nur sehr spärlich eingestreut bzw. ergänzt. (2) Die Verwendung von veraltetem, teils inkorrektem Bildmaterial erschwert die geistige Durchdringung komplexer dreidimensionaler Vorgänge. (3) Eine kritische Betrachtung der Nomenklatur lässt es unumgänglich

erscheinen, einige obsoletere, teils irreführende Begriffe durch zeitgemäßere Bezeichnungen zu ersetzen. (4) In vielen Aspekten der Kardiogenese herrschen noch immer äußerst widersprüchliche Ansichten. (5) Es gibt keine (deutschsprachige) Publikation, die den komplexen Gesamtprozess der Kardiogenese umfassend nach aktuellem Wissensstand darlegt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein über das didaktisch reduzierte Lehrbuchpensum hinausgehendes, verständliches Gesamtkonzept der Kardiogenese nach aktuellem Stand der Wissenschaft darzubieten, das Studierenden und Wissenschaftlern als fundierte Wissensgrundlage dienen kann. Dabei werden durch die Synthese von Morphogenese und transkriptionaler Regulation Lücken geschlossen, überholte Lehrmeinungen ins Reich der Geschichte verbannt und kontroverse Informationen zu umstrittenen Sachverhalten so weit als möglich verdichtet, um Ansatzpunkte und Impulse für zukünftige Forschungsarbeit zu liefern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Quellen und Arten der Literatur

Neben einschlägigen Lehrbüchern der veterinärmedizinischen Embryologie wurden v.a. Fachzeitschriftenartikel, Dissertationen und Fachbücher für die vorliegende Literaturstudie ausgewertet. Sowohl englisch- als auch deutschsprachige Publikationen wurden berücksichtigt. Als qualitativ höchstwertige Literaturquelle stellen Primärartikel aus international anerkannten Fachzeitschriften der biomedizinischen Wissenschaften den weitaus größten Anteil der hier verwendeten Schriften. Die ausgewerteten Daten umspannen einen Zeitraum von ca. 1945 bis 2017. Vereinzelt wurden auch ältere Veröffentlichungen einbezogen. Der Schwerpunkt liegt entsprechend des Arbeitstitels auf aktuelleren Publikationen (ab 2000).

Bei den ausgewerteten Fachzeitschriftenartikeln handelt es sich überwiegend um experimentelle Arbeiten aus dem Bereich der (embryologischen) Grundlagenforschung. Die Versuche umfassen das ganze Spektrum an modernen molekularbiologischen Analysemethoden, wie transgene Technologien (Insertions-, Deletionsmutationen), um die Signifikanz bestimmter Gene für die Morphogenese zu bestimmen oder um Zellschicksale zu verfolgen, immunhistochemische Techniken und In situ-Hybridisierung, um Proteine bzw. Nukleinsäuren im Gewebe nachzuweisen aber auch z.B. Transplantationsexperimente und elektronenmikroskopische Studien, sowie Computer-Modell-Studien bzw. häufig Kombinationen verschiedener Methoden. Die mit Abstand meistverwendeten Studienobjekte in den ausgewählten Publikationen sind Embryonen bzw. embryonale Zellen von Mäusen und Hühnern, aber auch vom Menschen und gelegentlich von Wachteln, Kaninchen sowie Ratten.

### 2.2 Literaturrecherche

Die Recherche nach Fachliteratur erfolgte nach dem Einlesen in die Thematik mittels Lehrbüchern via Internet in elektronischen Katalogen, wie z.B. dem OPAC der FU Berlin oder WorldCat (weltweit größtes Netzwerk von Bibliothekskatalogen), in Metakatalogen wie dem Karlsruher Virtuellen Katalog und Portalen, wie dem FU-Portal Primo und LIVIVO (Portal der Zentralbibliothek der Medizin in Köln) sowie in Datenbanken, wie MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute), Pubmed, Web of Science und der Suchmaschine Google Scholar.

Der umfangreichen Vernetzung zwischen verschiedenen Datenbanken und Katalogen bei der Suche im Portal steht der Vorteil einer Schlagwort-basierten Suche bei Katalogen (CABI-Thesaurus im FU OPAC) und bei einigen Datenbanken (MeSH-Terms in Pubmed) gegenüber. Überwiegend wurde mittels WorldCat, Primo und Web of Science gesucht. WorldCat und Primo bieten eine große Vielfalt an Literaturformaten (Fachbücher, Dissertationen, Journalartikel, Proceeding Papers etc.). Die Literaturdatenbank Web of Science listet eine Vielzahl an international anerkannten Journals.

Weiterhin wurden die Literaturverzeichnisse von Publikationen nach relevanten Artikeln durchsucht.

Der Zugriff auf Volltextversionen von Artikeln wird über Web of Science, da von der Freien Universität Berlin (ab 1945) lizenziert, oftmals gewährt. Alternativ wurden relevante Schriften über die Fernleihe oder den Dokumentenlieferdienst „Subito“ beschafft.

Im Folgenden wird die Literatursuche mittels Web of Science exemplarisch dargestellt. Initiiert wurde die Suche mit der Verknüpfung:

- (cardiogenesis) OR (cardiac OR heart) NEAR/0 development →8.061 Resultate

Nach dem Verschaffen eines Überblicks und der Eingrenzung des Themas wurde eine Gliederung erstellt. Mit deren Hilfe erfolgte die vertiefte Suche an Hand von Unterpunkten und speziellen Stichwörtern. Als Beispiel für das erste Kapitel „Ursprung der Herzzellen - von den kardiogenen Progenitoren der Blastula bis zum geraden Herzschlauch des Embryos“ soll folgender Suchablauf die Vorgehensweise veranschaulichen:

- gastrulation OR (mesoderm NEAR/5 formation)
- (cardi\* OR heart) NEAR/0 mesoderm
- (cardi\* OR heart) NEAR/0 (precursors OR progenitors OR “stem cells”)
- migration NEAR cardi\* (precursor OR progenitor)
- BMP AND (cardiac OR heart) development OR cardiogenesis; der Term BMP (Bone Morphogenetic Protein) wurde nachfolgend ersetzt durch weitere interessierende Transkriptions-/Wachstumsfaktoren/Gene etc. wie Nodal, FGF (Fibroblast Growth Factor), MesP1 (Mesoderm Posterior1), Isl1 (Islet-1), Nkx2.5 (NK-homeodomain2.5)
- “cardiogenic mesoderm” AND patterning OR (first OR second\* OR primary OR anterior) “heart field”
- “heart tube formation” OR “(endocardial OR myocardial) fusion” OR “fusion of cardi\* mesoderm”
- fusion AND “heart-forming (fields OR regions)”
- endocardi\* NEAR/5 (development OR formation OR origin) NOT endocarditis

Mit Hilfe des Operators NOT wurden bei zu großer Trefferliste Tierarten wie Zebrafisch, Krallenfrosch und Tauflicie von der Suche ausgeschlossen.

Die Literaturrecherche wurde endgültig am 2.9.2017 beendet.

## 2.3 Auswahlkriterien für verwendete Literatur

Die Ergebnisse der Literaturrecherche wurden nach folgenden Kriterien für die weitere Aufarbeitung ausgewählt:

- thematische Zugehörigkeit zur von mir vorgenommenen zunächst groben Gliederung der Thematik in (1) Ursprung der kardiogenen Vorläuferzellen, (2) Entstehung des geraden Herzschlauchs, (3) Herzscheifenbildung, (4) Entstehung von Vor- und Hauptkammern, (5) Septierung des Herzens, (6) Bildung der Herzklappen, (7) Entwicklung des Sinus venosus, (8) Entwicklung der großen herznahen Arterien, (9) Entstehung der Koronargefäße, (10) Bildung des kardialen Erregungsleitungssystems
- Ausschluss von Innervation des Herzens, Lymphgefäße des Herzens, intrinsisches adrenerges System, kongenitale und erworbene Herzerkrankungen (werden gelegentlich angesprochen, aber nicht explizit aufgearbeitet), MikroRNAs und epigenetische Faktoren/Einflüsse
- bei Genen, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren etc.: konkreter Bezug zur Morphogenese darstellbar (direkte oder indirekte Wirkung auf ein Ereignis), hohe Relevanz für Morphogenese (bei Defizienz mangelhafte Ausbildung spezieller morphologischer Strukturen)
- Reaktionen/Ereignisse am Plasmalemma bzw. auf extrazellulärer Ebene und Ereignisse im Zellkern auf DNA-Ebene sind von besonderem Interesse, allerdings wird nicht auf konkrete Interaktionsmechanismen zwischen verschiedenen Molekülen/ Transkriptionsfaktoren/ Genen eingegangen; demgegenüber werden Vorgänge im Zytoplasma, wie Transportvorgänge oder enzymatische Reaktionen vernachlässigt
- Studiendesign: Präferenz von in vivo-Studien gegenüber in vitro-Studien, bei letzteren Präferenz von Experimenten an originär kardiogenen Stammzellen gegenüber Stammzellen anderen Ursprungs

- Spezies: Mensch (*Homo sapiens*), Vogelartige, insbesondere Huhn (*Gallus gallus domesticus*) und Wachtel (*Coturnix coturnix*), Säugetiere wie Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus*), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) u.a.
- Ausschluss von Studien an niederen Wirbeltieren wie Zebrafisch (*Danio rerio*) und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) sowie noch ursprünglicheren Tierarten (bis auf vereinzelte Ausnahmen)
- Aktualität: jüngere Studien wurden bevorzugt, genauso wurden jedoch ältere Studien zu einem konkreten Themengebiet einbezogen, verglichen, ggf.integriert oder verworfen

## 2.4 Verarbeitung und Darstellung der ausgewählten Literatur

Die nach den oben genannten Eignungskriterien vorselektierten Publikationen (2.225) wurden als Literaturzitate im Literaturverwaltungsprogramm EndNoteX8® gespeichert und verwaltet. Die Volltexte wurden in elektronischer Form in nach der Gliederung sortierten Ordnern abgespeichert oder ausgedruckt. Das Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word wurde zur Darstellung der Daten genutzt.

Der Duktus dieser Arbeit orientiert sich primär an der Morphogenese des Herzens und ist daher im Ursprung chronologisch angelegt. Ab dem dritten Kapitel wird mit diesem Prinzip aus didaktischen Gründen wieder gebrochen, da die aus der Schleifenbildung hervorgehenden Prozesse zwar morphogenetisch und regulatorisch eng miteinander verknüpft sind, aber ihre Komplexität eine separate Betrachtung erforderlich macht.

In der nächsten Stufe wurden die Volltexte der vorselektierten Studien der Reihe nach entsprechend der groben Gliederung gelesen und bei relevanten Daten diese in Form von Stichpunkten extrahiert. Dies führte zum Ausschluss von 1.023 Studien.

An Hand der gewonnenen Informationen wurde die Gliederung in ihrer endgültigen, verfeinerten Form ausgebaut.

Die stichpunktartigen Daten wurden in einen fließenden Text zusammengefasst. Dabei erfolgt in jedem Kapitel eingangs eine kurze Einführung in bekanntes Wissen mit dem Hinweis auf veraltete oder umstrittene Sichtweisen.

Besonders bedeutsame Termini *technici* oder Gruppen bzw. Familien von Signalmolekülen wurden in kleinen Kästchen am Rand näher erläutert bzw. definiert. Die Informationen hierzu sind jeweils den Literaturstellen im Text entnommen.

Eine Vielzahl an Bildern, Schemata und Tabellen unterstützen Verständnis und Lebendigkeit der schriftlichen Ausführungen.



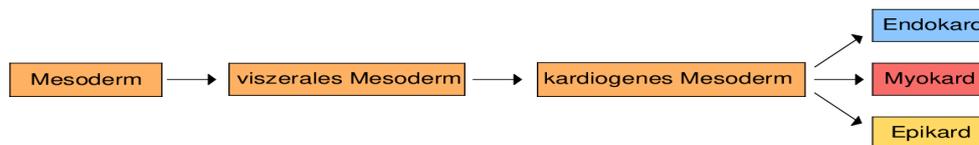
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ursprung der Herzzellen - von den kardiogenen Progenitoren der Blastula bis zum geraden Herzschlauch des Embryos

##### 3.1.1 Bisheriger Wissensstand und überholte Ansichten

Das Herz mit seinen drei Schichten, namentlich Endokard (innere Auskleidung), Myokard (Muskelschicht) sowie Epikard (äußere Umhüllung), entsteht kurz nach der Gastrulation\* überwiegend aus der kardiogenen Domäne des mittleren Keimblatts, dem sogenannten (kardiogenen) Mesoderm (Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Linask und Lash, 1993) (s. Abb.1).

**Gastrulation:** zentraler Vorgang der Embryogenese, durch den beim Amnioten die drei Keimblätter entstehen

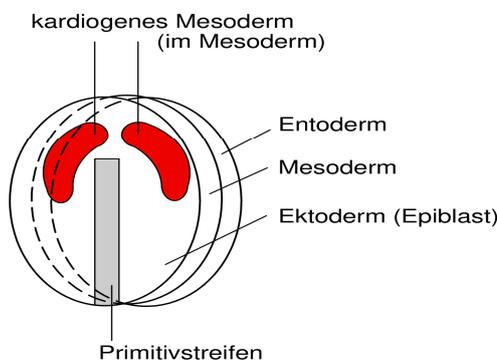


**Abb.1:** Schematische Darstellung der Entwicklung von Endokard, Myokard und Epikard aus dem Mesoderm (modifiziert nach Moorman und Christoffels, 2003; Abb.2)

Darüberhinaus sind auch Zellen aus Kopfmesoderm, Neuralleiste\* und prächordalem Entoderm am Aufbau des Herzens beteiligt (Kirby et al., 1983; Noden et al., 1995; Kirby et al., 2003; Hatzistergos et al., 2015; Chan et al., 2016).

Die kardiogenen Progenitoren befinden sich nach der Gastrulation beidseitig anterolateral des Primitivstreifens\* im Seitenplattenmesoderm (De Haan, 1964; Rosenquist, 1970) (s. Abb.2).

**Neuralleiste:** embryonale Struktur, die durch das Zusammenfallen des Ektoderms nach der Gastrulation entsteht

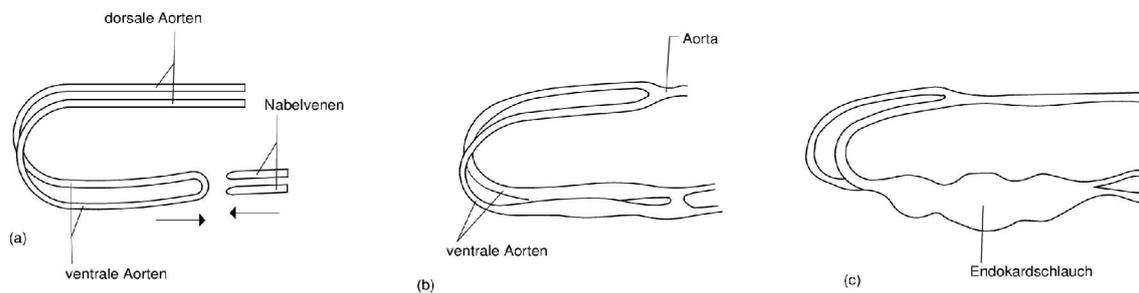


**Primitivstreifen:** durch Zellmigration und -proliferation hervorgebrachte streifenförmige Verdichtung im Epiblasten zu Beginn der Gastrulation

**Abb.2:** Dreischichtiger Keim nach der Gastrulation; eigene Darstellung

Das Seitenplattenmesoderm spaltet sich dann unter Ausbildung des intraembryonalen Zöloms, der späteren Perikardhöhle, auf in somatisches und viszerales Blatt mit dem kardiogenen Mesoderm im viszeralen Anteil (Linask et al., 1997; Rüsse und Sinowatz, 1998) (s. Abb.6). Beidseitig im viszeralen Mesoderm entstehende Endothel-Plexus (zukünftiges Endokard) fusionieren nach der lateralen und kranio-kaudalen Faltung des Embryos in der ventralen Mittellinie. Das nun singuläre, gerade Endokardrohr hat nach kranial Verbindung zu den paarigen ventralen Aorten sowie nach kaudal zu den ebenfalls paarigen Venae vitellinae (Synonym: Vv. omphalomesentericae, Dottersackvenen) des Embryos (Rüsse und Sinowatz, 1998).

In gegenwärtigen Lehrbüchern der veterinärmedizinischen Embryologie wird die Bildung des primitiven Herzschlauchs uneindeutig und z. T. unvollständig als Fusion zweier separat entstandener Herzschläuche (bzw. Endokardschläuche) beschrieben (McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010; Rüsse und Sinowatz, 1998 und 2015) (siehe Abb.3).



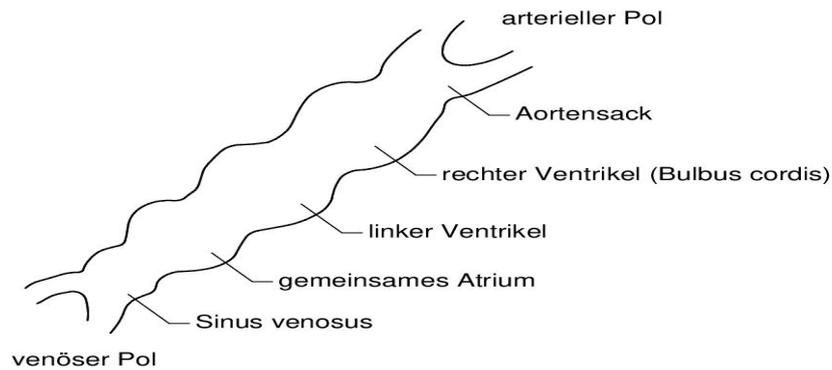
**Abb.3:** Obsolete Darstellung der Entstehung des geraden Herzschlauchs in Lehrbüchern; (a) Fusion der paarigen Endokard-/Herzschläuche mit den Nabelvenen, (b) Fusion der Endokardschläuche miteinander in der ventralen Mittellinie zum (c) singulären Endokardschlauch; modifiziert nach Hyttel, Sinowatz und Vejlsted, 2010, Abb.12.3

Diese obsolete Annahme beruht auf einer missverständlichen Interpretation der Studien von Benninghoff (1923), Davis (1927), Patten (1949) und Van Mierop (1979) sowie auf dem Fakt, dass bei Defizienz bestimmter Regulatoren dieses Vorgangs paarige Herzschläuche, sogenannte Cardia bifida, entstehen (siehe unter 1.6).

Davon abgesehen, dass die Entstehung von endokardialem und myokardialem Anteil des Herzschlauchs separat voneinander betrachtet werden müssen, gilt es mittlerweile als erwiesen, dass der von Anfang an unpaare (myokardiale) Herzschlauch durch die Fusion der bilateralen Herzfelder an der ventralen Mittellinie des Embryos entsteht (De Ruiter et al., 1992).

Lange Zeit hielt sich in den Lehrbüchern der Begriff „epimyokardialer Mantel“ (Rüsse und Sinowatz, 1998; McGready et al., 2006). Diese von Kölliker (1879) und De Haan (1965) geprägte obsolete Bezeichnung umschreibt die Umhüllung des Endokardrohrs und impliziert, dass das Epikard von Anfang an, wie auch das Myokard den Herzschlauch umgibt. Jedoch bildet sich die äußerste Schicht des Herzens erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt aus mesenchymalem Gewebe der kaudalen Perikardhöhle, das nach heutiger Auffassung ebenfalls dem kardiogenen Mesoderm zugeordnet wird (Viragh und Challice, 1981; Männer, 1992; Mommersteeg et al., 2010).

Hartnäckig hält sich in der Lehre auch die irreführende, fehlerhafte Darstellung des geraden Herzschlauchs als Aneinanderreihung unterschiedlicher expandierter Segmente, aus denen die Kompartimente des adulten Herzens hervorgehen (variierend: Sinus venosus, Atrium, Ventrikel, Bulbus cordis, Truncus arteriosus; Davis, 1927; Stalsberg und De Haan, 1969; Rüsse und Sinowatz, 1998; De la Cruz und Sanchez-Gomez, 1998; McGready et al., 2006; Hyttel, Sinowatz und Vejlsted, 2010) (s.Abb.4).



**Abb.4:** Überholte Darstellung des geraden Herzschlauchs mit allen Segmenten des zukünftigen Herzens; modifiziert nach Moorman und Christoffels, 2003; Abb.1B

Sie führt zu der falschen Vorstellung, der gerade Herzschlauch entstünde, alle primitiven Komponenten des reifen Herzens in Reihe enthaltend, in einem Zuge aus dem kardiogenen Mesoderm (Davis, 1927).

Nach aktuellem Kenntnisstand besteht der lineare Herzschlauch jedoch aus wenig mehr als den Vorläuferzellen des linken Ventrikels. Die weiteren Kompartimente werden erst nach und nach zum arteriellen und venösen Pol hinzugefügt (De la Cruz et al., 1989; Cai et al., 2003; Meilhac et al., 2004a; Buckingham et al., 2005; Rana et al., 2007).

Diese Erkenntnis, die bereits vor langer Zeit anhand morphologischer Studien demonstriert wurde, leider aber in Vergessenheit geriet (Viragh und Challice, 1973; Arguello et al., 1975), lieferte dem Verständnis der Herzmorphogenese entscheidende Impulse und führte zur Theorie, dass das Herz zeitlich abgestuft aus zwei unterschiedlichen Progenitorpopulationen, dem Ersten und dem Zweiten Herzfeld, hervorgeht.

### 3.1.2 Ursprung der kardiogenen Precursoren

#### 3.1.2.1 Aufbau des Embryos vor der Gastrulation

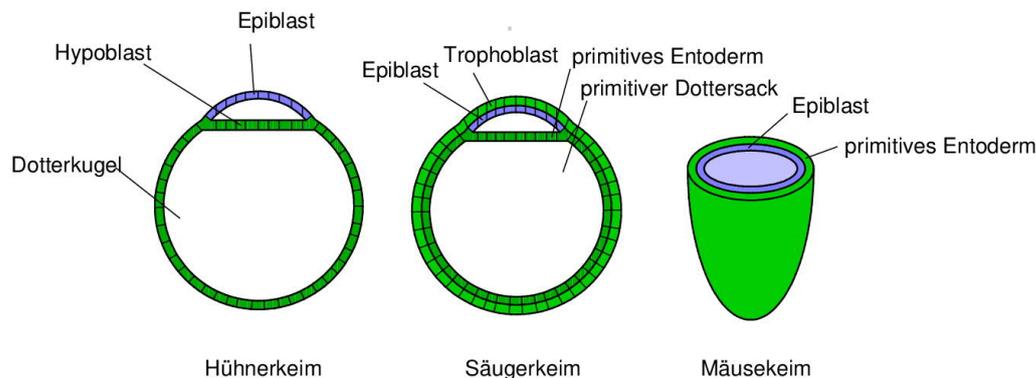
Im späten Blastula-Stadium kurz vor der Gastrulation beginnt mit der Etablierung der Körperachsen und der primären Gewebsschichten die Herausbildung des grundlegenden Körperbauplans des Vertebraten-Embryos. In dieser Phase besteht der Embryo von Amnioten\* aus zwei in ihrer Gesamtheit als Keimscheibe bezeichneten konzentrischen, epithelialen Schichten, dem dorsal gelegenen Epiblasten und dem darunter liegenden primitiven Entoderm, das beim aviären Embryo als Hypoblast bezeichnet wird (Hyttel et al., 2010; Idkowiak et al., 2004; Rashidi und Sottile, 2009).

Aus dem Epiblast entsteht der Embryo selbst mit seinen drei Keimblättern. Das primitive Entoderm wird später durch Epiblastzellen, die das definitive embryonale Entoderm bilden, in extraembryonale Bereiche verdrängt.

Die Keimscheibe des Vogelembryos sitzt der Dotterkugel auf, wohingegen die Keimscheibe des Säugerembryos von Anfang an von einer extraembryonalen Struktur, dem Trophoblasten umgeben ist, der die Implantation in die Uterusschleimhaut gewährleistet. Eine Besonderheit stellt der Keim der Maus, auf die als Präferenz-Säugetier der embryologischen Forschung in den folgenden Abhandlungen häufig Bezug genommen wird, dar. Bedingt durch seine Becherform mit äußerem Entoderm und innen liegendem Epiblasten weichen die Lagebezeichnungen von denen der anderen Säuger- sowie Vogelembryonen ab (Eyal-Giladi und Kochav, 1976; Lawson und Schoenwolf, 2001; Kinder et al., 2001; Idkowiak et al., 2004; Arnold und Robertson, 2009; Saiz und Plusa, 2013) (siehe Abb.5).

**Amnioten:**  
Landwirbeltiere, deren Embryonen sich in einer mit Fruchtwasser gefüllten Amnionhöhle entwickeln, die von einer Fruchthülle (Amnion) gebildet wird (Reptilien, Vögel, Säuger)

Der Einfachheit halber und um Verwirrung vorzubeugen, werden den folgenden Ausführungen die topographischen Verhältnisse der Keimscheibe, wie sie auch im menschlichen sowie im Kaninchenembryo zu finden ist, zugrunde gelegt (Viebahn, 1999).



**Abb.5:** Form des Keims zu Beginn der Gastrulation bei verschiedenen Amnioten (Trophoblast und primitive Dottersackhöhle des Mäusekeims sind nicht mit eingezeichnet); modifiziert nach O'Farrell, Stumpff und Su, 2004, Abb.2 und 3

Dementsprechend werden die Lagebezeichnungen der initialen embryonalen Scheibe (anterior/posterior, rechts/links) an die veränderten Körperachsen nach der Faltung angepasst (kranial/kaudal, dorsal/ventral, rechts/links). Humanmedizin und Biologie verwenden z.T. andere Lagetermini (siehe Moorman et al., 2007, Box1).

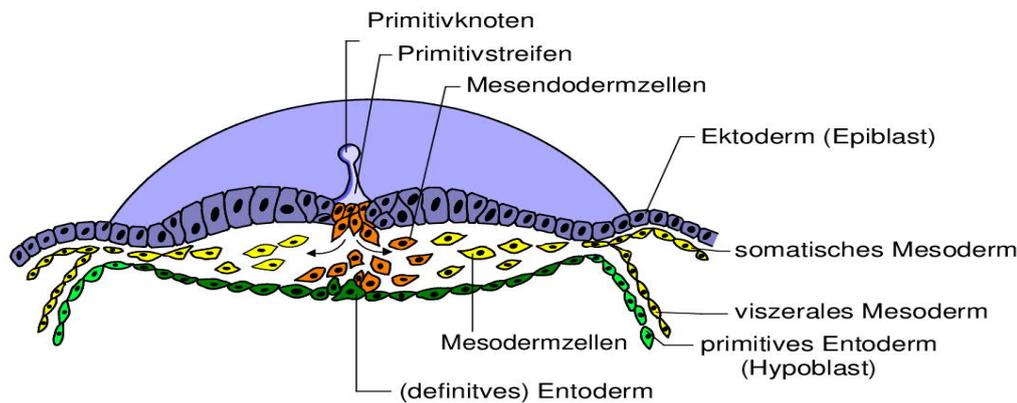
### 3.1.2.2 Induktion der kardiogenen Progenitoren im posterioren Epiblast

Die prospektiven Herzzellen residieren im Blastula-Stadium im postero-lateralen Epiblasten (Lawson et al., 1991; Hatada und Stern, 1994; Parameswaran und Tam, 1995; Yatskievych et al. 1997; Tam et al., 1997).

Komplexe molekulare Interaktionen zwischen primitivem Entoderm und Epiblast führen zur Etablierung spezifischer Genexpressionsmuster, welche die Gastrulation einleiten (Bertocchini et al., 2004).

Zu Beginn dieses Prozesses wandern Zellen aus dem posterioren Epiblasten, einschließlich der prospektiven Herzzellen, zur Mittellinie, was zur Entstehung des Primitivstreifens führt. Diese streifenförmige Verdichtung innerhalb des Epiblasten stellt eine Art Transitzone für Epiblastzellen dar, deren Schicksal es ist, nach Durchlaufen einer epithelio-mesenchymalen Transition\* in den Subepiblastraum vorzudringen und sich dort auszubreiten, um an der Etablierung extraembryonaler Strukturen und des definitiven embryonalen Ento- und Mesoderms mitzuwirken (siehe Abb.6).

**epithelio-  
mesenchymale  
Transition:**  
Entstehung  
motiler, unpo-  
larisierter  
Zellen aus  
polarisierten  
Zellen eines  
Zellverbands  
durch verän-  
derte Expres-  
sion von Zell-  
adhäsionsmo-  
lekülen



**Abb.6:** Darstellung der Gastrulation; Epiblastzellen wandern aus der Primitivstreifenregion in den Subepiblastraum, werden zu sogenannten Mesendodermzellen (orange), die sowohl intra- als auch extraembryonales Mesoderm (gelb) und Entoderm (grün) aufbauen; Auftrennung des intraembryonalen Mesoderms in somatisches und viszerales Blatt (modifiziert nach Hyttel, Sinowatz und Vejlsted, 2010, S. 83, Abb.7-6)

In Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Epiblasten bzw. im Primitivstreifen wird einzelnen Subpopulationen durch zeitlich abgestimmte, zielgerichtete Zellbewegungen ein bestimmtes Schicksal zugeteilt (Parameswaran und Tam, 1995; Lopez-Sanchez et al., 2009).

Die Induktion der Gastrulation und speziell des (kardiogenen) Mesoderms im posterioren Epiblasten erfolgt nach bisherigem Wissensstand durch die Interaktion der interzellulären Signalmoleküle *Nodal*, *FGF8*, *BMP4* sowie dem kanonischen *Wnt*-Signalweg (Conlon et al., 1994; Sun et al., 1999; Winnier et al., 1995; Liu et al., 1999).

*Nodal*, ein Wachstumsfaktor der *TGF* (*Transforming Growth Factor*\*)  $\beta$ -Familie, wird zu Beginn und während der Gastrulation im primitiven Entoderm und in Zellen des posterioren Epiblasten exprimiert, die nachfolgend den Primitivstreifen durchwandern. *Nodal* fördert in Kooperation mit dem *T-box*-Transkriptionsfaktor *Eomes* die Delamination der mesodermalen Vorläuferzellen im posterioren Epiblasten (Conlon et al., 1994; Varlet et al., 1997; Arnold et al., 2008; Dräger, 2013).

Das Expressionsmuster von Wachstumsfaktor *FGF8* ähnelt dem von *Nodal*. Seine Expression in posterioren Epiblastzellen wird äquivalent zu *Nodal* herunterreguliert, sobald die zukünftigen Mesodermzellen den Primitivstreifen verlassen. *FGF8* wird im Zusammenspiel mit im anterioren Bereich des Primitivstreifens *FGF8*-abhängig exprimiertem *FGF4* eine wichtige Rolle bei der Migration der posterioren Epiblastzellen zugeschrieben (Crossley und Martin, 1995; Sun et al., 1999; Ciruna und Rossant, 2001; Yang et al., 2002; Matsui et al., 2008).

Kanonische *Wnt*\*-Signale und *BMP4* sind bei Mäusen unerlässlich für die Gastrulation (Winnier et al., 1995; Haegel et al., 1995; Liu et al., 1999; Somi et al., 2004).

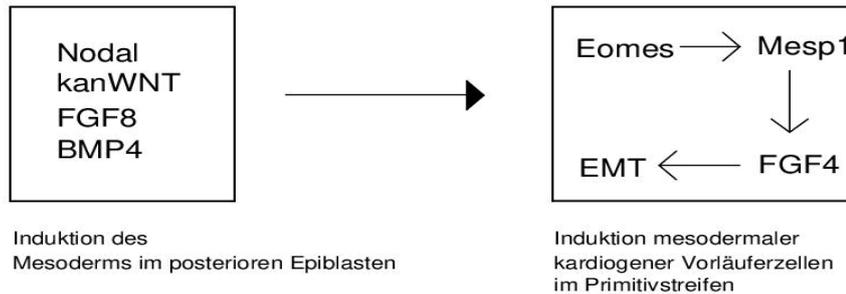
Nach Studien an humanen embryonalen Stammzellen erwirken *BMP(4)* und kanonische *Wnt*-Signale (*Wnt3* und *Wnt8A*) durch indirekte Repression von *Sox2*, ein Transkriptionsfaktor und Mesoderm-Antagonist, und Induktion der *Brachyury*-Expression (Mesoderm-Marker; Transkriptionsfaktor der *Tbox*-Familie) die Bildung des Mesoderms (Gertow et al., 2013; Rao et al., 2016; Mazzotta et al., 2016). *BMP*-Signale sind auch notwendig für die Herunterregulation von *Nodal* (Pereira et al., 2012) (siehe Abb.7).

**Transforming Growth Factor (TGF):**  
Familie von Signalproteinen (Polypeptide), Unterfamilien TGF $\alpha$  und TGF $\beta$  (1-3 bei Säugern bekannt); beeinflussen u.a. Zellproliferation und -differenzierung

**Fibroblast Growth Factor (FGF):**  
Familie von Signalproteinen (Ein-Ketten-Polypeptide, FGF1-FGF23 bekannt), wichtige Regulatoren von Zellproliferation, Migration und Differenzierung

**Bone Morphogenetic Protein (BMP):**  
Signalproteine (Polypeptide), Untergruppe der TGF $\beta$ -Familie; Regulation von Zellproliferation und -differenzierung

**Wnt-Signalweg:**  
Die *Wnt*-Faktoren sind sezernierte Glykoproteine.. Man unterscheidet zwischen dem kanonischen oder  $\beta$ -Catenin-Weg ( $\beta$ -Catenin= Protein, intrazellulärer Signalüberträger dieses Wegs) mit den Liganden *Wnt1*, *3*, *3A* und *8* und dem nicht-kanonischen Signalweg mit dem Liganden *Wnt11*



**Abb.7:** Induktion kardiogener Progenitoren; EMT: epithelio-mesenchymale Transition, kanWNT: kanonisches Wnt-Signal, FGF4/8: Fibroblast Growth Factor4/8, BMP4: Bone Morphogenetic Protein4, Eomes: Eomesodermin, MesP1: Mesoderm posterior1; eigene Darstellung

### 3.1.2.3 Prä-Spezifikation kardiogener Progenitoren im Primitivstreifen

Die kardiogene Subpopulation mesodermaler Vorläuferzellen befindet sich am E 6.5 des Mäuse-Embryos (HH3 im Hühnerembryo) im anterioren Drittel des Primitivstreifens in einer bestimmten antero-posterioren Sequenz, die interessanterweise mit ihrer Anordnung im späteren Herzschlauch korrespondiert (von anterior nach posterior: Zellen des zukünftigen Ausflusstrakts (alt: Bulbus cordis), der Ventrikel, der Atrien, des Sinus venosus).

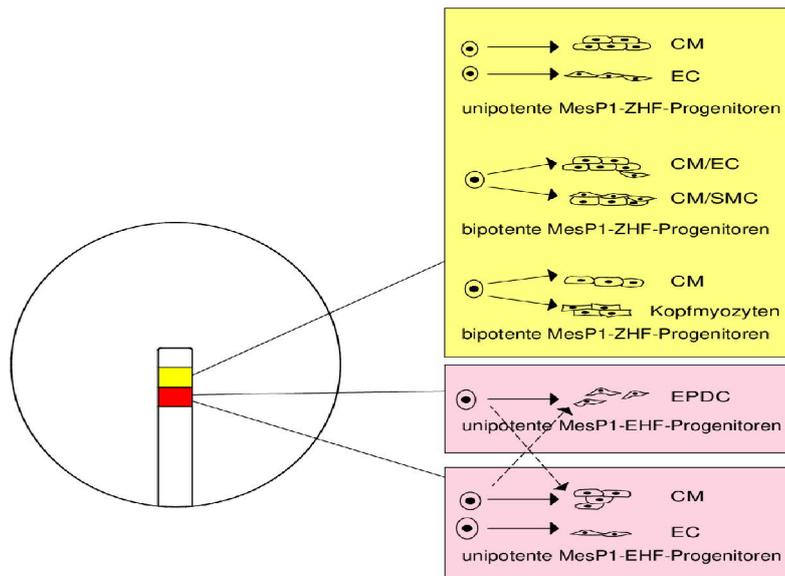
Die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht endgültig auf ihre spätere Lokalisation festgelegt (Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Redkar et al., 2001; Camp et al., 2012).

Dennoch findet bereits zu diesem Zeitpunkt die Zuordnung der Zellen zum Ersten (posterior gelegene Zellen) und Zweiten Herzfeld (anteriore Zellen) sowie die Segregation zukünftiger myokardialer, endokardialer, epikardialer sowie glatter Muskelzellen statt, wobei ein Teil (weniger als 5%) der Progenitoren v.a. des Zweiten Herzfelds bipotente Eigenschaften behält (Wei und Mikawa, 2000; Milgrom-Hoffmann et al., 2011; Lescroart et al., 2014; Devine et al., 2014) (siehe Abb.8). Diese Ergebnisse überraschen und widersprechen der bisherigen Annahme einer Multipotenz kardiovaskulärer Progenitoren in vivo äquivalent zu ihren in vitro-Pendants (Moretti et al., 2006; Kattmann et al., 2006 und 2007; Bondue et al., 2008).

Der durch kanonische Wnt-Signale induzierte Transkriptionsfaktor *Eomes* aktiviert ab E6.5 den Transkriptionsfaktor *MesP1* (*Mesoderm posterior1*) in den bis dahin multipotenten kardiogenen Progenitoren im Primitivstreifen (Costello et al., 2011; Van den Aemele et al., 2012).

*MesP1* gilt als frühester Marker (jedoch nicht ausschließlich) kardiovaskulären Mesoderms und umfasst Progenitoren von Myokard, Endokard, Epikard und von vaskulären glatten Muskelzellen des Herzens (Saga et al., 1996 und 2000; Milgrom-Hoffmann et al., 2011; Chan et al., 2013; Lescroart et al., 2014). Er reguliert als notwendige Voraussetzung für die Spezifikation\* dieser Zellen die *Nodal*-Expression herunter und ist an der Kontrolle einiger für die Kardiogenese bedeutsamer „Schlüssel-Gene“, u.a. *Nkx2.5* und *GATA4*, beteiligt (Lindsley et al., 2008; Bondue et al., 2008; Costello et al., 2011). Die *MesP1*-Expression leitet die Restriktion der Entwicklungspotenz kardiovaskulärer Progenitoren ein (Lescroart et al., 2014).

**Spezifikation:**  
durch das Einwirken bestimmter Signalmoleküle erwerben kompetente Zellen ein spezifisches, aber reversibles Schicksal



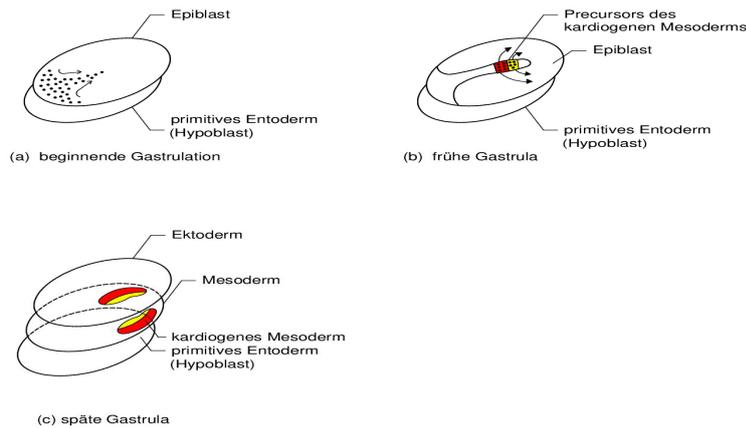
**Abb.8:** Segregation der kardiogenen Progenitoren im Primitivstreifen; rot: Vorläuferzellen des Ersten Herzfelds (EHF), frühe *MesP1* (*Mesoderm Posterior1*)-Expression; gelb: Vorläuferzellen des Zweiten Herzfelds (ZHF), späte *MesP1*-Expression; CM: Kardiomyozyten; EC: Endokardzellen; SMC: Glatte Muskelzellen; EPDC: „epicardium-derived cells“ (zu-künftige Epikardzellen und deren Abkömmlinge), modifiziert nach Lescroart et al., 2014

*FGF4* wird *FGF8*-abhängig in einem antero-posterioren Gradienten im Primitivstreifen exprimiert. *FGF4* fördert via Transkriptionsfaktor *Snail*-mediierter Hemmung der Produktion von *E-Cadherin*, eines wichtigen Zelladhäsionsmoleküls mesodermaler Vorläufer, die epithelio-mesenchymale Transition und damit die Migration dieser Zellpopulation (Ciruna und Rossant, 2001). Darüberhinaus ist *FGF4* ein positiver Regulator der *kanonischen Wnt*-Aktivität im Primitivstreifen. Dieser Signalweg fördert Proliferation und Migration prospektiven kardiogenen Mesoderms bei gleichzeitiger Hemmung der Differenzierung (Kwon et al., 2007, 2008).

Zukünftige Mesoderm- und Entodermzellen durchwandern dann zwischen E 6.5 und E 7.5 bzw. HH3-4 den Primitivstreifen und breiten sich im Subepiblastraum aus, was in der Entstehung von definitivem Mesoderm und Entoderm resultiert. Die verbleibenden Epiblastzellen bilden das Ektoderm.

Nach Vollendung ihrer Migration durch den Primitivstreifen akkumulieren die Vorläuferzellen des Herzens beidseitig anterolateral links und rechts im vorderen Seitenplattenmesoderm in Form bilateraler Felder kranial des Primitiv- bzw. Hensenknotens (Rosenquist und DeHaan, 1966, Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Tam et al., 1997).

Bemerkenswert hierbei ist, dass, je weiter anterior zukünftige Mesodermzellen im Primitivstreifen liegen, desto weiter medial sind sie später im definitiven Mesoderm zu finden, wohingegen posterior gelegene Zellen sich im Mesoderm eher lateral ansiedeln (siehe Abb.9).



**Abb.9:** Migration kardiogener Progenitoren; (a) Zellwanderung aus dem posterioren Epiblast zur Mittellinie, Entstehung des Primitivstreifens; (b) Lokalisation kardiogener Vorläuferzellen im Primitivstreifen, rot: posteriore Fraktion (Erstes Herzfeld), gelb: anteriore Fraktion (Zweites Herzfeld); (c) Ansiedlung der kardiogenen Zellen im Seitenplattenmesoderm; eigene Darstellung

Geleitet wird die Migration der Zellen vom Primitivstreifen weg durch z.T. chemotaktische Signale von benachbarten Geweben, vom Primitivknoten und vom Primitivstreifen selbst.

Das differenzierte zeitlich-räumliche Wechselspiel der Wachstumsfaktoren *FGF8*, der als Repellens fungiert, und *FGF4* als „Lockstoff“ aus der sich bildenden Chorda dorsalis, führt zum beobachteten Bewegungsmuster der Zellen, das also nicht zellautonom, sondern abhängig von der Position im Primitivstreifen ist (Yang et al., 2002; Sun et al., 1999). *Mesp1* kontrolliert vermutlich im Zusammenspiel (gemeinsame Aktivierung von Zielgenen) mit *FGF* Geschwindigkeit und Richtung der migrierenden Zellen (Chiapparo et al., 2016).

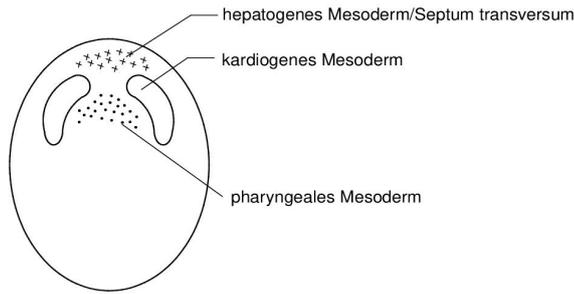
*Wnt3A* ist zumindest beim Huhn als vom Primitivstreifen produzierter repulsiver Faktor, der zytoskelettale Prozesse mediiert, in Interaktion mit *BMP2* via Smad1-Transkriptionsfaktor ebenfalls an der Auswanderung der mesodermalen Zellen beteiligt (Yue et al., 2008; Song et al., 2014). Auch *PDGF*\*A-Signale via *PDGF-Rezeptor a* auf den mesodermalen Zellen spielen eine Rolle (Fredriksson et al., 2004; Yang et al., 2008).

**PDGF-Platelet-derived Growth Factor**  
Wachstumsfaktoren, bilden Dimere aus den vier verschiedenen Polypeptiden PDGF A,B,C und D

### 3.1.3 Etablierung des kardiogenen Mesoderms

#### 3.1.3.1 Spezifikation der prospektiven Herzzellen

Nach der Ansiedlung der kardiogenen Progenitoren beidseitig im kranialen Seitenplattenmesoderm (Maus am E7.5; Huhn HH4) spricht man vom kardiogenen Mesoderm. Kaudal davon befindet sich das pharyngeale Mesoderm, aus dem überwiegend Kopfstrukturen hervorgehen, kranial liegt das Mesoderm des Septum transversum (siehe Abb.10).



**Abb.10:** Lage des kardiogenen Mesoderms im mittleren Keimblatt und topographische Beziehung zu benachbarten mesodermalen Populationen am E7.5 bzw. HH4; eigene Darstellung

Die exakte Bestimmung von Ort und Ausdehnung des kardiogenen Mesoderms ist kompliziert, da es nicht statisch ist, sondern einer starken Dynamik, bedingt durch morphogenetische Prozesse und fortwährende Rekrutierung weiterer Progenitoren aus benachbarten Geweben unterworfen ist (Cai et al., 2003; Meilhac et al., 2004a). Potentielle Marker wie der Transkriptionsfaktor *Nkx2.5* (*NK-homeodomain2.5*) sowie der Wachstumsfaktor *BMP2* haben sich als unzuverlässig erwiesen (Redkar et al., 2001).

Signale aus dem ventral und in enger Nachbarschaft zum präkardialen Mesoderm gelegenen kranialen Entoderm beim Huhn bzw. aus dem sogenannten viszeralem Entoderm bei der Maus, sowie aus dem kardiogenen Mesoderm selbst, induzieren die Festlegung auf das kardiogene Schicksal und die terminale Differenzierung in den dafür empfänglichen, „kompetenten“ kardiogenen Vorläuferzellen (Alsan und Schultheiss, 2002; Nijmeijer et al., 2009; Saiz und Plusa, 2013).

Induktive Signale werden dabei von solchen inhibitorischer Art aus anderen Geweben ausbalanciert.

Am ausführlichsten sind diese Vorgänge an Kardiomyozyten untersucht worden, auf die sich die folgenden Ausführungen beziehen. Die molekularen Interaktionen, die zur Entstehung des Endokards führen, werden unter Punkt 1.7 dargelegt.

Die Genese des Epikards wird, der Chronologie entsprechend, erst im zweiten Abschnitt abgehandelt.

Die Spezifikation zukünftiger Kardiomyozyten erfolgt nach derzeitigem Wissen durch eine Kombination aus *BMP*-, *FGF*- und *Wnt*-Signalen.

Eine entscheidende Rolle hierbei kommt den vom kranialen Entoderm sezernierten Wachstumsfaktoren *BMP2* und *4* zu. Sie leiten die Expression kardiogener Transkriptionsfaktoren wie u.a. *Nkx2.5*\*, *GATA*\**4*, *SRF*\* (*Serum Response Factor*) und *eHAND*\* sowie herzspezifischer Strukturproteine wie z.B. *MHC* (*Myosin Heavy Chain*), *Titin* und *sarkomerisches Myosin* in Zellen des präkardialen Mesoderms und somit deren Differenzierung ein (Laverriere et al., 1994; Schultheiss et al., 1997; Schlange et al., 2000; Nakajima et al., 2002; Barron et al., 2005; Balsa und Misra, 2006; Nijmeijer et al., 2009). Jedoch verhindert eine *BMP2*-Defizienz bei der Maus, im Gegensatz zum Huhn, die Spezifikation nicht, da möglicherweise vom Mesoderm sezerniertes *BMP5* und *-7* eine redundante Funktion besitzen (Zhang und Bradley, 1996; Solloway und Robertson, 1999; Klaus et al., 2012).

Vom primitiven Entoderm exprimierter *FGF8* induziert in Kooperation mit *Nodal* beim Huhn bereits im Blastula-Stadium *BMP*-unabhängig die Expression für die frühe Myofibrillogenese bedeutsamer Strukturproteine, allen voran *SMA* (*Smooth Muscle alpha-Actin*) im posterioren Epiblasten (Matsui et al., 2006 und 2008).

Nach der Etablierung des kardiogenen Mesoderms wird *FGF8* beim Mäusembryo sowohl dort als auch im darunterliegenden Entoderm (beim Huhn nur im Entoderm) exprimiert und

**Nkx2.5:**  
Homöobox\*-Protein, steuert die Herzentwicklungs-kaskade maßgeblich

**Homöobox:**  
charakteristische Sequenz von Genen, kodieren für Transkriptionsfaktoren, die typischerweise eine ganze Kaskade anderer funktionell zusammenhängender und in morphogenetischem Kontext stehender Gene anschalten

**GATA-Transkriptionsfaktoren:**  
GATA 1-6; enthalten charakteristische Zinkfinger-Domäne

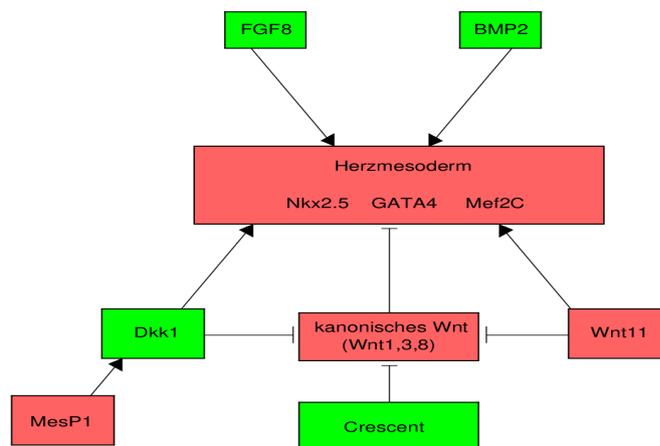
**SRF:**  
Transkriptionsfaktor, beeinflusst v.a. die Expression „schnell aktivierbarer“ Zielgene (sog. Immediate Early Genes)

**eHAND:**  
basischer Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, unter Kontrolle von *Nkx2.5* stehend

reguliert gemeinsam mit und abhängig von *BMP2* die Induktion herzspezifischer Gene (Crossley und Martin, 1995; Barron et al., 2000; Alsan und Schultheiss, 2002).

Eine transiente induktive Funktion wird auch für andere *FGF*-Mitglieder (*FGF2* und *4*) vermutet (Barron et al., 2000).

Die Auswirkung der kanonischen und nicht-kanonischen *Wnt*-Signalwege auf die Kardiogenese ist zeitlich-räumlich äußerst differenziert und ihre induktive Funktion vermutlich eher indirekter Natur. Nach der initialen Festlegung der Herzprogenitoren fördern kanonische *Wnt*-Signale aus dem präkardialen Mesoderm in der ersten Phase seine Expansion bei gleichzeitiger Hemmung der Differenzierung. Um die Differenzierung der Kardiomyozyten einzuleiten, ist in der zweiten Phase die Unterdrückung des kanonischen *Wnt*-Wegs notwendig, wodurch die Kardiogenese-Blockade durch die Transkriptionsfaktoren *Msx1* und *CDX2/1* aufgehoben wird (Mazzotta et al., 2016; Rao et al., 2016). Dies geschieht zum einen via mesodermal exprimiertem *Wnt11* und andere *Wnt*-Liganden über den nicht-kanonischen Signalweg und zum anderen durch die vom Entoderm bzw. Mesoderm sezernierten Antagonisten des kanonischen *Wnt*-Signalwegs *Crescent* und *MesP1*-induziertem *Dickkopf-1* (*Dkk1*) (Eisenberg und Eisenberg, 1999, 2007; Marvin et al., 2001; Maye et al., 2004; David et al., 2008; Liu et al., 2009b; Onizuka et al., 2012; Cohen et al., 2012). *Crescent*, *Dkk1* und *Wnt11* ermöglichen wahrscheinlich die Initiierung der Kardiogenese durch die Etablierung einer Zone geringer kanonischer *Wnt*-Aktivität im Bereich des präkardialen Mesoderms. Dieser *Wnt*-Aktivitätsgradient entlang der kraniokaudalen Achse überkreuzt sich mit dem *BMP*-Gradienten entlang der dorsoventralen Achse. In Folge dessen kommt es zur Induktion der Kardiogenese in Regionen mit hoher *BMP*- und geringer kanonischer *Wnt*-Aktivität (Marvin et al. 2001) (siehe Abb.11).



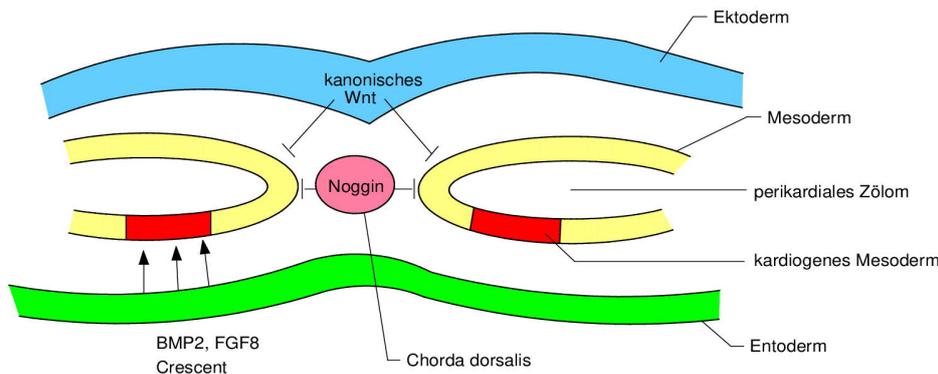
**Abb.11:** Schematische Darstellung induktiver Einflüsse auf das kardiogene Mesoderm aus dem Entoderm (grün) und dem zukünftigen kardiogenen Mesoderm (rot) selbst, FGF8: Fibroblast Growth Factor8, BMP2: Bone Morphogenetic Protein2, Dkk1: Dickkopf1, Nkx2.5: NK homeodomain2.5, GATA4: GATA-DNA-Sequenz bindender Transkriptionsfaktor, Mef2C: Myocyte enhancing factor 2C, MesP1: Mesoderm Posterior1; modifiziert nach Brand, 2003; Abb.2A

### 3.1.3.2 Etablierung des perikardialen Zöloms

Nach der Auftrennung des anterioren Seitenplattenmesoderms in viszerales und somatisches Mesoderm und Entstehung des perikardialen Zöloms zwischen später Gastrula und früher Neurula (E7.5, HH7), ist das kardiogene Mesoderm nur auf das viszerale Mesoderm begrenzt (Linask et al., 1992). Dies steht in enger Nachbarschaft zum pharyngealen Entoderm ventral, welches weiterhin die Kardiogenese-fördernden Faktoren *BMP*, *FGF* und *Crescent* exprimiert.

Die aus dem axialen Mesoderm entstandene Chorda dorsalis\* sezerniert den *BMP2*-Antagonisten *Noggin*, wodurch die Kardiogenese nach medial begrenzt wird (Yuasa et al., 2005). Kanonische *Wnt*-Signale vom dorsal des kardiogenen Mesoderms gelegenen Neuroektoderm limitieren die Ausdehnung der Kardiogenese im anterioren paraxialen Mesoderm (Tzahor und Lassar, 2001). Gleichzeitig dienen sie vermutlich der Unterteilung der herzbildenden Region in myogene und nicht-myogene Kompartimente, denn kanonische *Wnt*-Signale etablieren in der medialen Randzone des kardiogenen Mesoderms, aus dem später das dorsale Mesokard hervorgeht, eine Region fortgesetzter Proliferation, aus der das kardiogene Mesoderm und der spätere Herzschlauch mit Vorläuferzellen gespeist wird (Raffin et al., 2000) (siehe Abb.12).

**Chorda dorsalis:** zwischen Neuralrohr und Darm gelegener mesodermaler zentraler Achsenstab der Wirbeltier-Embryonen mit regulatorischer Funktion auf molekularer Ebene



**Abb.12:** Räumliche Beziehung zwischen Geweben, die nach der Bildung des perikardalen Zöloms Kardiogenese-fördernde (Pfeil) und -hemmende (unterbrochener Pfeil) Signale produzieren, BMP2: Bone Morphogenetic Protein2, FGF8: Fibroblast Growth Factor8; modifiziert nach Brand, 2003; 2B

### 3.1.4 Determinierung\* im kardiogenen Mesoderm

Am E7.5 vollzieht sich bei der Maus die Fusion der bilateralen Herzfelder in der Mittellinie, kranial der buccopharyngealen Membran, durch kraniale Migration ursprünglich medial in den Herzfeldern angesiedelter Vorläuferzellen. Die entstandene Struktur wird nun als Herzhalbmond bezeichnet (DeRuiter et al., 1992). Entgegen früherer Ansichten bleiben beim Huhn die bilateralen Herzfelder bis etwa HH9, also bis zur Entstehung des geraden Herzschlauchs separiert (Colas et al., 2000; Redkar et al., 2001; Cui et al., 2009). Die Kardiomyozyten, die aus dem epithelialisierten viszeralen Mesoderm des perikardialen Zoeloms hervorgehen, werden durch die komplexe Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, allen voran *Nkx*-, *GATA*- und *MEF*- Familienmitglieder, auf ihr Schicksal festgelegt.

**Determinierung:** irreversible Festlegung von Zellen auf ein spezifisches Schicksal, unabhängig von der molekularen Umwelt

Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Nkx2.5* gilt als einer der frühesten (präkardiales Mesoderm, E7, HH5) sowohl in myokardialen als auch in endokardialen Vorläuferzellen exprimierten Transkriptionsfaktoren und spezifischen Herzmarker. Er führt zur unwider-ruflichen Festlegung der exprimierenden Mesodermzellen auf die Kardiomyozytenlinie. Transiente *Nkx2.5*-Expression findet jedoch auch in Entoderm und Ektoderm statt. Es handelt sich hierbei also nicht um einen ausschließlichen Herzmarker (Lints et al. 1993; Schultheiss et al., 1995; Christoffels et al., 2006; Ma et al., 2008).

Durch Herunterregulierung proliferationsfördernder Wachstumsfaktoren wie *Isl-1* und *BMP2* und Aktivierung der hierarchischen Kaskade kardiogener Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine limitiert *Nkx2.5* die Kardiomyozytenspezifikation und leitet die terminale Differenzierung ein (Sepulveda et al., 1998, 2002; Bruneau et al., 2000; Jamali et al., 2001; Prall, 2007).

Den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren *GATA4* und *6* kommt ebenfalls eine kritische Rolle bei der transkriptionalen Kontrolle der Kardiomyozyten-Differenzierung zu. *GATA4*

koaktiviert mit *Nkx2.5* im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren herzmuskel-spezifische Promotoren, z.B. für die *ANF* (*Atrialer Natriuretischer Faktor*)- oder die *Alpha cardiac actin*-Expression (Sepulveda et al., 1998; Luna-Zurita et al., 2016). *GATA4* und *6* besitzen funktionelle Redundanz und sind unentbehrlich für den Beginn der Kardiomyozyten-differenzierung (Zhao et al., 2008).

Der Transkriptionsfaktor *SRF* (*Serum Response Factor*) verstärkt in Assoziation mit *Nkx2.5* und *GATA4* die transkriptionale Aktivität von Genen, die die Kardiomyozytendifferenzierung begleiten (Sepulveda et al., 2002; Balza und Misra, 2006).

Der von *Nkx2.5* aktivierte Transkriptionsfaktor *Mef2C* (*Myocyte enhancing factor*) ist ebenfalls ein wichtiger übergeordneter Regulator myokardialer Gene (Lin et al., 1997).

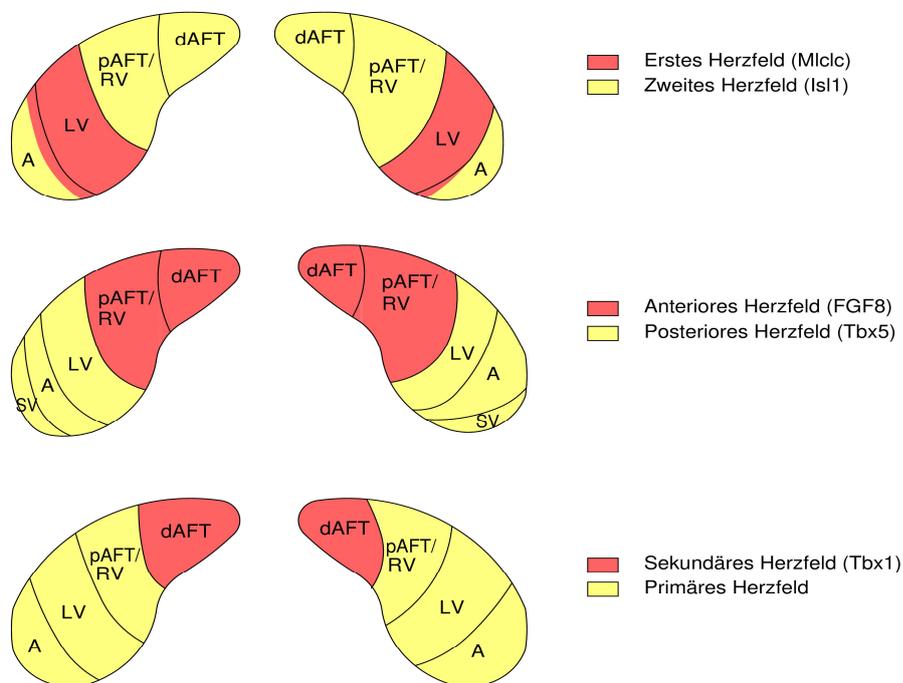
### 3.1.5 Musterbildung\* innerhalb des kardiogenen Mesoderms

#### 3.1.5.1 Lokalisation der unterschiedlichen Herzfelder

Der primitive, gerade Herzschlauch besteht zunächst nur aus einigen Komponenten des reifen Herzens, nämlich dem Primordium von linkem Ventrikel, Atrioventrikularkanal und einem Teil des primitiven gemeinsamen Atriums. Die Progenitoren dieser Komponenten rekrutieren sich aus dem sogenannten Ersten Herzfeld. Die übrigen Komponenten werden erst nach und nach aus einem als Zweites Herzfeld bezeichneten Progenitorpool an den arteriellen und venösen Pol hinzugefügt (Mjaatvedt et al., 2001; Cai et al., 2003; Zaffran et al., 2004; Buckingham et al., 2005; Rana et al., 2007; Snarr et al., 2007a; Galli et al., 2008).

Das Zweite Herzfeld liegt im Herzhalbmond bei der Maus bzw. in den bilateralen Herzfeldern beim Huhn medial des Ersten Herzfelds (siehe Abb.13).

**Musterbildung**  
Zellen erlangen ein räumlich differenziertes Muster von Zellschicksalen



**Abb.13:** Schema der drei geläufigsten Herzfelddefinitionen, oben: Erstes vs. Zweites Herzfeld, Mitte: Anteriores vs. Posteriore Herzfeld, unten: Sekundäres vs. Primäres Herzfeld; A- primitives Atrium, SV- Sinus venosus, LV/RV- rechter/ linker Ventrikel, pAFT/dAFT- proximaler/ distaler Ausflusstrakt; modifiziert nach Abu-Issa und Kirby, 2007, Abb.2

Neben dieser populärsten Variante der Unterteilung der kardiogenen Vorläuferpopulation existieren weitere Möglichkeiten:

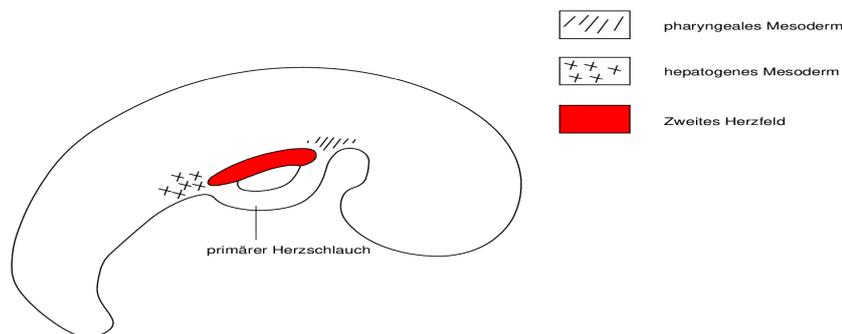
Das sogenannte Anteriore Herzfeld umschreibt eine zuerst identifizierte anteriore, im Bereich des pharyngealen Mesoderms gelegene Vorläuferpopulation, aus der ausschließlich Strukturen des arteriellen Herzpols, also rechter Ventrikel und Ausflusstrakt sowie die späteren intraperikardialen Anteile von Aorta und Truncus pulmonalis, hervorgehen. Aus dem Posterioren Herzfeld gehen die übrigen Bestandteile des Herzens hervor (Mjaatvedt et al., 2001; Kelly und Buckingham, 2002; Cai et al., 2003; Zaffran et al., 2004) (siehe Abb.13).

Das Sekundäre Herzfeld wiederum bezieht sich in Abgrenzung zum Primären Herzfeld nur auf eine kleine kardiogene Vorläuferpopulation in enger Nachbarschaft zum bzw. in Überlappung mit pharyngealem Mesoderm, aus der Ausflusstraktmyokard und glatte Muskulatur der späteren Arterienstämme generiert werden (Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001; Dyer und Kirby, 2009; reviewed in Abu-Issa et al., 2004 und Abu-Issa, 2014) (siehe Abb.13).

Die im Vergleich zum Ersten Herzfeld später erfolgende Differenzierung der Zellen des Zweiten Herzfelds lässt sich möglicherweise durch ihre Lage medial des Ersten Herzfelds erklären. Diese bedingt eine geringere Konzentration an differenzierungsfördernden *BMP2*-Signalen und eine höhere Konzentration an *BMP2*-Antagonisten und kanonischen *Wnt*-Signalen (Tzahor und Lassar, 2001). *Nkx2.5* fördert in diesem Umfeld die proliferationsfördernden kanonischen *Wnt*-Signale (Cambier et al., 2014).

Im Herzhalbmondstadium bei der Maus (bilaterale Herzfelder beim Huhn) grenzt das kardiogene Mesoderm mediokaudal an das pharyngeale Mesoderm und kranial an das hepatogene Mesoderm (Septum transversum).

Nach der Faltung der embryonalen Scheibe und der Fusion der Abkömmlinge des Ersten Herzfelds in der ventralen Mittellinie erstreckt sich das Zweite Herzfeld von der kraniodorsalen bis zur kaudodorsalen Wand der Perikardhöhle und ist via dorsalem Mesokard (mesodermale Aufhängung des Herzschlauchs) in Kontinuität mit dem primitiven Herzschlauch, nach kranial mit den mesodermalen Kernen der Kiemenbögen (pharyngeales Mesoderm) und nach kaudal mit dem Septum transversum (hepatogenes Mesoderm). Den beiden letztgenannten Regionen wird ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Vorläuferzellen für das Herz zugeschrieben (Kelly et al., 2001; Christoffels et al., 2006; Abu-Issa und Kirby, 2008; Van den Berg et al., 2009; Harel et al., 2012) (siehe Abb.14).



**Abb.14:** Lage kardiogener Vorläuferpopulationen nach der Bildung des primitiven Herzschlauchs; eigene Darstellung

### 3.1.5.2 Genexpressionsmuster in den Herzfeldern

Im kardiogenen Mesoderm lassen sich unterschiedliche Genexpressionsmuster feststellen, die mit den unter 3.1.5.1 beschriebenen Regionen korrespondieren und für die Proklamation unterschiedlicher Herzfelder herangezogen werden.

Der Kardiomyozyten-Differenzierungsmarker *Mlc2a* wird zur Definition des Ersten Herzfelds verwendet (Cai et al., 2003).

Im Gegensatz dazu charakterisiert der LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Islet-1* (*Isl1*) ab E7.5 das kranio-medial des Ersten Herzfelds gelegene Zweite Herzfeld (Cai et al., 2003). *Isl1* ist im Komplex mit dem Co-Faktor *Ldb1* (*LIM-domain binding protein*) ein übergeordneter transkriptionaler Regulator kardiogener Progenitoren (Caputo et al., 2015).

Im späteren Herzschauch wird *Isl1* anfänglich noch im entstehenden Ausflussteil exprimiert, stark abnehmend im rechten Ventrikel, gar nicht im linken Ventrikel und teilweise in den Atrien. Eine Defizienz führt zu starker Reduktion des Ausflustrakts und schwacher Reduktion der Atrien (Cai et al. 2003).

Entgegen früherer Annahmen ist *Isl1* jedoch kein exklusiver Marker von Progenitoren des Zweiten Herzfelds. Jüngere Untersuchungen beweisen, dass *Isl1* bereits im präkardialen Mesoderm des Ersten Herzfeldes exprimiert wird (Moretti et al., 2006; Sun et al., 2007; Qyang et al., 2007; Ma et al., 2008). Mit beginnender Differenzierung wird dieser Marker kardiovaskulärer Progenitoren herunterreguliert. Dies geschieht zeitlich versetzt zuerst im Ersten Herzfeld, dessen Zellen vor denen des Zweiten Herzfelds differenzieren (Kang et al., 2009).

*FGF8* und *FGF10* werden in einem kranio-kaudalen Gradienten im Zweiten Herzfeld exprimiert und sind v.a. für die Entwicklung des arteriellen Herzpols (rechter Ventrikel, Ausflustrakt) von Bedeutung. Ihre Expressionsdomäne wird dem Anterioren Herzfeld zugeschrieben (Kelly et al., 2001; Ilagan et al., 2006). Der unter der Kontrolle von *Retinsäure*, dem biologisch aktiven Derivat von Vitamin A, stehende Transkriptionsfaktor *T-box5* wird in den postero-lateralen Regionen des kardiogenen Mesoderms exprimiert und in einem kaudokranialen Gradienten mit höchstem Grad in der sinoatrialen Region im späteren Herzschauch. *Tbx5* markiert damit das posteriore Pendant zum Anterioren Herzfeld und umfasst im Gegensatz zum Ersten Herzfeld auch die Sinus venosus-Progenitoren (Bruneau et al. 1999; Xavier-Neto et al., 1999; Abu-Issa und Kirby, 2008).

*T-box1*, ein Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich im Kopfmesoderm und im pharyngealen Entoderm vorkommt, wird in Zellen des sogenannten Sekundären Herzfelds exprimiert (Hu et al., 2004; Zhang et al., 2005). Er wird durch *Forkhead-box*-Proteine (*Foxh*) reguliert und verstärkt, mediiert über *FGF8/10*, die mitotische Aktivität und hemmt die Differenzierung von *Tbx1*-exprimierenden Zellen (Hu et al., 2004; Chen, 2009). Aus diesem Progenitorpool sollen ausschließlich der Ausflustrakt und die intraperikardialen Anteile von Aorta und Truncus pulmonalis entstehen (Waldo et al., 2001 und 2005b). Neueren Erkenntnissen zufolge spezifiziert *Tbx1* aber auch Vorläuferzellen für den venösen Herzpole (Rana et al., 2014).

Auch *Hox*\*-gene sind an der kranio-kaudalen Musterbildung im Zweiten Herzfeld beteiligt, wobei ihre Funktion hierbei noch weitgehend unbekannt ist. Die kaudale Domäne des Zweiten Herzfelds, aus dem überwiegend Komponenten des venösen Herzpols hervorgehen, demarkiert sich durch die spezifische Expression der Homöoboxgene *Hoxa1* und *Hoxa3*, wohingegen *Hoxb1* v.a. im anterioren Teil des Zweiten Herzfelds exprimiert wird (Galli et al., 2008; Bertrand et al., 2011; Roux und Zaffran, 2016).

*Retinsäure*, die, wie bereits erwähnt, in einem kaudokranialen Gradienten im Zweiten Herzfeld produziert wird, kontrolliert sowohl *FGF8* als auch die *Hox*-Gene und damit die kranio-kaudale Musterbildung im Herzfeld (Sirbu et al., 2008; Bertrand et al., 2011). Darüberhinaus beschränkt *Retinsäure* via *FGF8*-mediierter Hemmung von *Isl1* die kaudale

**Hox-Gene:**  
kodieren für phylogenetisch tief konservierte Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich in die Spezifikation der antero-posterioren Achse des Embryos eingebunden sind

Expansion von Progenitoren des Zweiten Herzfelds (Sirbu et al., 2008; Ryckebusch et al., 2008; Kumar et al., 2014).

Die Vorläuferzellen von Sinus venosus (embryonales Einmündungsgebiet der systemischen venösen Zuflüsse) und Epikard, die aus den kaudolateralen Randzonen des kardiogenen Mesoderms hervorgehen und sich im Herzschlauch-Stadium in der kaudalen Zölonwand nahe dem hepatogenen Mesoderm befinden, weisen eine besondere genetische Signatur auf. Sie unterscheiden sich von übrigen Herzfelddefinitionen durch den frühzeitigen (E7.5) Verlust der *Isl1*- und *Nkx2.5*-Expression. Stattdessen exprimieren sie ab E8.25 den Transkriptionsfaktor *Tbx18*, weshalb hier von einigen Autoren ein drittes Herzfeld postuliert wird (Schlueter et al., 2006, Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010).

### 3.1.5.3 Klonale Analyse der Herzfelder

Klonale Analysen bei der Maus bestätigen die Existenz zweier Zellstammlinien. Die früher auftretende, mit dem Ersten Herzfeld übereinstimmende erste Zellstammlinie generiert den gesamten linken Ventrikel, zum Teil den Atrioventrikularkanal, Teile der Atrien und in geringem Ausmaß auch den rechten Ventrikel. Aus der zweiten Stammlinie entstehen der Ausflusstrakt (rechter Ventrikel und Truncus arteriosus), Teile der Atrien sowie Sinus venosus bzw. spätere Venae cavae. Diese zweite Zellstammlinie entspricht dem Zweiten Herzfeld (Mjaatvedt et al., 2001; Meilhac et al. 2004a; Zaffran et al., 2004; Lescroart et al., 2012 und 2014).

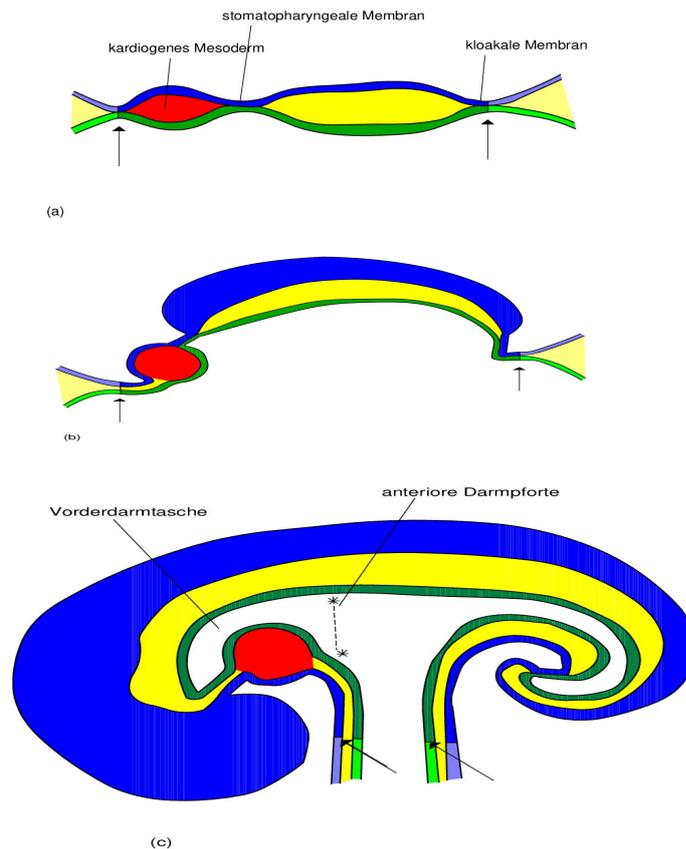
Lescroart et al. (2014) belegten, dass diese zwei Zelllinien vermittelt durch zeitlich aufeinanderfolgende *MesP1*-Expression bereits im Primitivstreifen voneinander segregieren.

### 3.1.6 Entstehung des geraden Herzschlauchs und Differenzierung\* der Kardiomyozyten

Der primitive unpaare Herzschlauch entsteht durch Fusion der bilateral symmetrischen Herzfelder an der ventralen Mittellinie des Embryos (De Ruiter et al., 1992). Grundlage hierfür ist die Ventralfaltung der embryonalen Scheibe durch das in Relation zu den extraembryonalen Geweben massive Wachstum des Keims und v.a. des Neuralrohrs. Die periphere Grenze der embryonalen Scheibe wird dadurch zum Nabel des Embryos (Moorman et al., 2007) (siehe Abb. 15, nächste Seite).

Die zwischen Promyokard und Entoderm akkumulierenden proendokardialen Zellen bilden durch Koaleszenz Plexus (Gefäßgeflechte), die zunehmend größere Lumina umschließen. Ob vor der Fusion der Herzprimordien (im engeren Sinne: zukünftiges Myokard) zwei separate Endokardschläuche in den Schenkeln des kardiogenen Mesoderms existieren, die nachfolgend zu einem singulären Schlauch verschmelzen, oder ob das Endokard zu diesem Zeitpunkt noch plexiform ist, wird kontrovers diskutiert (Viragh et al., 1989; De Ruiter et al., 1992, 1993; Harris und Black, 2010).

**Differenzierung:** Zellen exprimieren spezifische molekulare Marker, die ihnen ihre spezifische Funktionsausübung ermöglichen



**Abb.15:** Faltung der embryonalen Scheibe bei der Maus; blau: Ektoderm, grün: Entoderm, gelb: Mesoderm, rot: kardiogenes Mesoderm; die Pfeile kennzeichnen den Übergang zwischen intra- und extraembryonalem Gewebe bzw. den Nabel; modifiziert nach Moorman et al., 2007; Abb.2

Die Entstehung von Herzschauch und Vorderdarm sind eng miteinander verknüpft. Die initial rostro-kaudale Faltung des Entoderms zwischen HH7 und HH10 beim Huhn bzw. zwischen E7.75-8.0 bei der Maus hat die Bildung der Vorderdarmlasche zur Folge, die kaudal durch die anteriore Darmpforte gebunden ist. Zytoskelettale Kontraktion im Entoderm, speziell im Bereich der anterioren Darmpforte, ist die treibende Kraft für die Einstülpung und den Deszensus der anterioren Darmpforte. Nachfolgend kommt es auch zur latero-ventralen Faltung. Das kardiogene Mesoderm wird so überwiegend passiv unter Rotation um 120-130° zur ventralen Mittellinie „gezogen“. Während der Fusion der Darmpforte kommt es dann zur Subduktion des kardiogenen Mesoderms unter das Entoderm (Varner und Taber, 2012; Ye et al., 2015; Shi et al., 2015). Lediglich Zellen nahe der ventralen Fusionslinie weisen eine erhöhte Motilität auf. Diese ist wichtig für den Verschluss der Herzfelder in Reißverschlussmanier (Stalsberg und DeHaan, 1968; Moreno-Rodriguez et al., 2006; Abu-Issa und Kirby, 2008; Cui et al., 2009a; Shi et al., 2015). Bei der Maus spielt das extraembryonal gelegene anteriore viszerale Entoderm als Signalgeber (*BMP2*) in der Anfangsphase der Faltung, und in der späteren Phase die dem Epiblasten selbst entstammenden (embryonalen) Gewebe eine wichtige Rolle (Madabhushi und Lacy, 2011; Gavrilov und Lacy, 2013).

*Sphingosin-1-phosphat*-Signale via *Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor2* in der Zellmembran der Entodermzellen kontrollieren die Entoderm-Konvergenz und damit auch die Migration der kardiogenen Progenitoren (Ye et al., 2015; Xie et al., 2016).

Zugkräfte durch Rückbildung des Primitivstreifens und Verlängerung der Chorda sind hingegen, anders als früher angenommen, nicht von Bedeutung (Stalsberg und DeHaan, 1968; Varner und Taber, 2012).

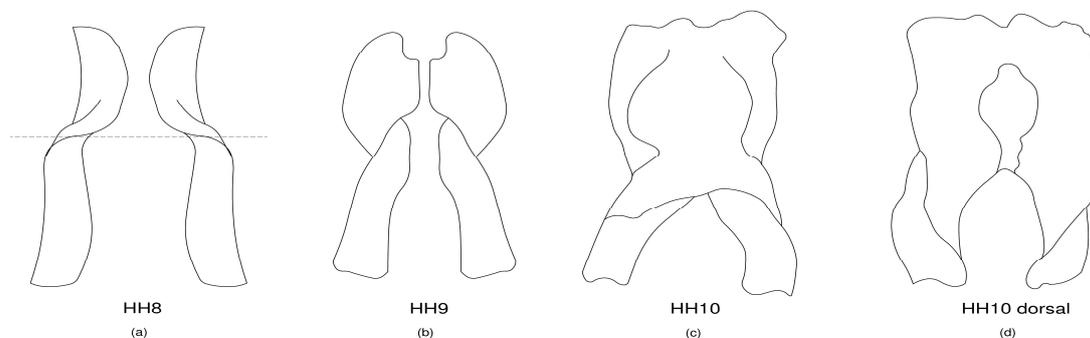
Die Rotation des kardiogenen Mesoderms erklärt die Aufrechterhaltung der kraniokaudalen Polarität der prospektiven Herzzellen im Primitivstreifen und im späteren Herzschlauch (Lopez-Sanchez et al., 2001; Abu-Issa, 2014).

Die initiale Fusion des Herzmesoderms erfolgt ab E7.5 bzw. HH9 in Höhe der anterioren Darmpforte (Stalsberg und DeHaan, 1969; Tam et al., 1997; Moreno-Rodriguez et al., 2006; Abu-Issa und Kirby, 2008).

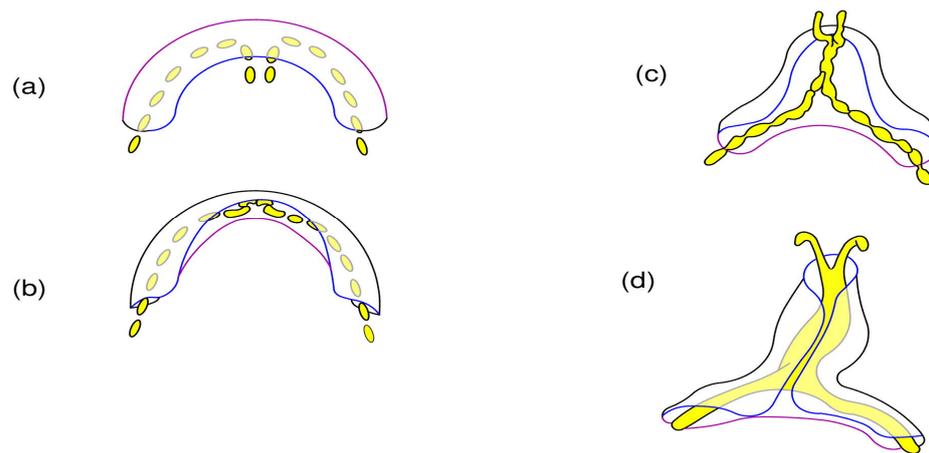
In diesem Stadium erstreckt sich das Zölon von der bukkopharyngealen Membran kranial bis zum ersten Somiten kaudal und vom paraxialen Mesoderm medial zum extraembryonalen Mesoderm lateral. Der kraniale Teil des Herzmesoderms befindet sich in den mediodorsalen Wänden des rechts- und linksseitigen Zöloms. Er enthält die Progenitoren für den rechten Ventrikel und den proximalen Teil des Ausflustrakts und steht in Verbindung mit dem zukünftigem Aortensack, den Kiemenbogenarterien und dem Kopfmesoderm. Der kaudale Anteil des kardiogenen Mesoderms liegt in den ventralen Zölomwänden und besteht aus den Vorläuferzellen für linken Ventrikel, Atrioventrikularkanal und den sinoatrialen Elementen. Beim Huhn besitzt das kardiogene Mesoderm in dieser Phase die Form eines Schmetterlings, wohingegen bei der Maus die bilateralen Herzfelder bereits vor der Faltung zu einem Halbmond verschmolzen sind (De Ruiter et al., 1992; Moreno-Rodriguez et al., 2006; Abu-Issa und Kirby, 2008)

Der Übergang zwischen vorderen und hinteren Flügeln des Herzmesoderms beim Hühnerembryo in Höhe der anterioren Darmpforte ist gleichzeitig der Inversionspunkt für die mediolaterale Rotation der kardiogenen Platte. Der Inversionspunkt verschiebt sich in Kohärenz mit der sich zurückziehenden anterioren Darmpforte nach kaudal. Die Ventralfusion des Herzmesoderms setzt sich zuerst im Zuge der Verlagerung der anterioren Darmpforte nach kaudal und etwas später auch nach kranial fort (Arguello et al., 1975; Moreno-Rodriguez et al., 2006; Abu-Issa und Kirby, 2008).

Nach vollendeter Ventralfusion (E9.0; HH10) ist ein dorsal offener sogenannter Herztrog entstanden, der sich erst im Verlauf der Herzschleifenbildung vollständig schließt (s. Abb.16A und B).



**Abb.16A:** Fusion der bilateralen Herzfelder beim Huhn; (a) bis (c): Ventralansicht, Linie in (a) kennzeichnet den Inversionspunkt, (d) Dorsalansicht, dorsal offener Herztrog; HH:-Hamburger Hamilton-Stadium; modifiziert nach Abu-Issa und Kirby, 2008; Abb.2 und 3



**Abb.16B:** Fusion des Herzhalbmondes bei der Maus (a-d) in der Dorsalansicht; gelb: Endokard, farblos: Myokard, die blaue Linie markiert die Grenze des Herzhalbmondes zum pharyngealen Mesoderm, die violette Linie stellt die Grenze zum hepatogenen Mesoderm dar; modifiziert nach De Jong et al., 1997, Abb.3A und Moorman et al., 2007; Abb.3

Der primitive Herztrog/-schlauch, der v.a. aus den Primordien der apikalen, trabekulären Ventrikelregionen besteht, ist durch das dorsale Mesokard in seiner gesamte Länge im perikardialen Zölom aufgehängt (DeRuiter et al., 1992; Männer et al., 2000).

Ein weiterer Aufbau des Herzschlauchs erfolgt dann durch kontinuierliches Hinzufügen von mesodermalen Vorläuferzellen aus dem Zweiten Herzfeld. Dieses erstreckt sich zu diesem Zeitpunkt vom Kiemenbogenmesoderm kranial über das Zölomepithel der dorsomedialen Region der Perikardhöhle bis zur Septum transversum-Region, einschließlich des dorsalen Mesokards (Buckingham et al., 2005; Snarr et al., 2007a). Mechanischer Stress im Zweiten Herzfeld selbst, vermutlich ausgelöst durch die Elongation sowie Kontraktion des Herzschlauchs, durch Elongation anderer Teile bzw. des gesamten Embryos oder auch Kompression durch Wachstum des venösen Pols, fördert die gerichtete Zellproliferation. Besonders ausgeprägt ist die physikalische Belastung in der kaudodorsalen Wand der Perikardhöhle, wo dementsprechend auch die höchsten Proliferationsraten zu verzeichnen sind (Van den Berg et al., 2009; Francou et al., 2017).

Der Prozess der Ventralfusion ist anfällig für eine Reihe von Störungen, die die Entstehung zweier separater Herzschräuche, sogenannter Cardia bifida, zur Folge hat. Beispiele dafür sind eine v.a. entodermale *GATA4*-Defizienz, Transkriptionsfaktor *HIF* (*Hypoxia-inducible-factor*) *1 alpha*-Defizienz, Hemmung spezifischer Matrix-Metallo-Proteinasen (Enzyme, die die Adhäsion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix beeinflussen) oder das Durchtrennen der Vorderdarntasche in der Mittellinie (DeHaan, 1959; Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997; Compennolle et al., 2003; Linask et al., 2005).

Auch zytoskelettale, adhäsive und extrazelluläre Strukturproteine sowie deren Regulatoren spielen hierbei eine Rolle. So ist die Ablagerung von *Fibronectin*, eines Zelladhäsionsmoleküls, an der ventralen Mittellinie nötig für die Wanderung der myokardialen Progenitoren. Bei komplettem Verlust von *Fibronectin* werden die adhärierenden Verbindungen zwischen den Kardiomyozyten nicht ordnungsgemäß ausgebildet. Die Zell-Matrix-Interaktion ist jedoch notwendig für die epitheliale Organisation und diese wiederum unabdingbar für die Migration (Linask und Lash, 1988; Trinh und Stainier 2004; Ye et al., 2015).

Auch ein Mangel an *N-Cadherin*, eines an der Etablierung der Polarität von Kardiomyozyten beteiligten Kalzium-abhängigen Zelladhäsionsmoleküls, führt zu einer fehlerhaften Ventralfusion. Im Herzschlauch wird es im gesamten Myokard exprimiert (Linask, 1992).

Die *Rho-GTPasen* sind bedeutende intrazelluläre Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und der Mikrotubuli-Dynamik. Sie ermöglichen die Etablierung intrazellulärer Asymmetrie mit Zellformveränderung und Zellbewegung durch differentielle Protrusion und Kontraktion des Aktinzytoskeletts (reviewed in Etienne-Manneville und Hall, 2002). *RhoA* wurde beim Huhn zwischen HH6 und 9 in Herzvorläufergewebe identifiziert. Inhibition resultiert in der Bildung von *Cardia bifida* (Kaarbo et al. 2003).

Diese Ergebnisse indizieren, dass auch die aktive Zellmigration insbesondere an der ventralen Fusionslinie bei der Fusion der Herzprimordien eine wichtige Rolle spielt (Moreno-Rodriguez et al., 2006).

Die Differenzierung der Kardiomyozyten beginnt beim Hühnerembryo noch vor der Herzschlauchbildung zwischen HH7 und HH9 in den bilateralen Herzfeldern bzw. zwischen E7.5 und E9 im Herzhalbmond beim Mäuseembryo (Lints et al., 1993; Sugi und Lough, 1995; Moreno-Rodriguez et al., 2006). Unter der Aktivität von *Nkx2.5* und *BMP2/4* kommt es über die Transkriptionsfaktoren *Serum Response Factor (SRF)* und *Myokardin* zur Expression zahlreicher myokardialer Gene wie *Cardiac Troponin 1 (cTnT1)*, *Sarkomerisches Myosin (MF20)*, *alpha-Actin*, *Sarkomerisches alpha-Actinin*, *Titin*, *Myosin Heavy Chain (MHC)* u.a. anfänglich in einer zentral gelegenen Unterdomäne des Herzfeldes und schließlich im gesamten Herzschlauch (Nakajima et al., 2002; Balza und Misra, 2006). Die aus ihnen translatierten Strukturproteine sind an der Myofibrillogenese beteiligt. Die korrekte Zusammensetzung und Ausrichtung der Myofibrillen beeinflusst entscheidend die Fähigkeit des Myokards, auf hämodynamischen Stress zu reagieren und die entsprechende Herzmuskelarchitektur zu etablieren (Kano et al., 2012; England et al., 2016).

*Myokardin* und *MEF2C*, ein früher Marker der myogenen Stammlinie, verstärken sich in einem *SRF*-unabhängigen Mechanismus gegenseitig (Molkentin et al., 1995; Creemers et al., 2006). *SRF* steht in der Hierarchie der Sarkomerogenese weit oben, da er Faktoren des Biomineralisierungsprogramms wie *Periostin*, *GATA6* und *BMP4*, welche die Myogenese hemmen, blockiert (Niu et al., 2007).

Die myokardialen Gene *Myosin Light Chain2v (MLC2v)*, *Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF)*, *Myocyte Enhancing Factor 2C (Mef2C)* u.a. werden bei einer *Nkx2.5*-Defizienz reduziert exprimiert (Lyons et al. 1995; Tanaka et al. 2000; Prall et al. 2007).

Hypoxie im Embryo (Sauerstoffversorgung unter zwei Prozent) scheint ein wichtiger Motor für die Herzentwicklung zu sein. Sie führt zur Expression von *Hypoxia-inducible-factors (HIFs)*, Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits kardiogenese-fördernde Gene anschalten (Compernelle et al., 2003).

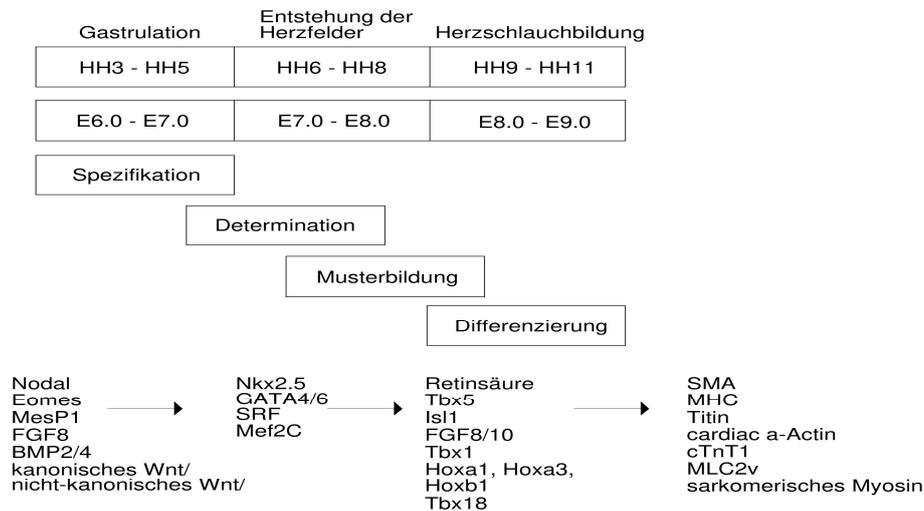
Spezialisierte Schrittmacher- und Erregungsleitungsstrukturen sind zu Beginn der Herzschlauchbildung noch nicht entwickelt. Es kommt jedoch zur Generierung spontaner Aktionspotenziale, noch bevor die Kardiomyozyten kontrahieren können, durch einen primordialen Schrittmacherloкус im links-kaudalen Segment des Herzschlauchs (Kamino et al., 1981).

Die Entwicklung der anatomischen sowie molekularen elektrophysiologischen Substrate im Herzschlauch ist eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Differenzierung der Kardiomyozyten und die weitere Morphogenese des Herzens (Linask et al., 2001). V.a. die korrekte Expression der für die Regulation des intrazellulären myokardialen Kalziumhaushalts essentiellen Strukturen, wie des sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauschers *NCX1*, des Kalzium-bindenden Chaperons *Calreticulin* und des Kalzium-permeablen Kanals *TRPV1* aber auch anderer Ionenkanäle ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung (Cho et al. 2000; Linask et al., 2001; Teng et al., 2015; Qi et al., 2015; Faustino et al., 2016).

Die Myofibrillogenese geht äußerst schnell vonstatten. Strukturproteine der Sarkomere sind frühzeitig, z. T. bereits kurz nach der Spezifikation in den Kardiomyozyten nachweisbar. So sind erste, noch ungerichtete Kontraktionen schon kurz nach der Etablierung des primitiven, geraden Herzschlauchs (beim Huhn ab HH12; Maus am E8.5) nachweisbar, die alsbald in

gerichtete peristaltische Kontraktionen transformieren (Tokuyasu und Maher 1987; Hu und Clark, 1989; Kamino 1991; reviewed in Männer et al., 2010; Kozlovsky et al., 2016; Wang et al., 2016).

Die Abbildung 17 umreißt abschließend noch einmal die in den initialen Phasen der (Myo-) Kardiogenese relevanten molekularen Faktoren.



**Abb.17:** „Meilensteine der frühen Herzentwicklung“ in Verbindung mit den korrespondierenden Entwicklungsstadien bei Huhn und Maus sowie relevanten Genen; Eomes: Eomesodermin, MesP1: Mesoderm Posterior1, FGF8/10: Fibroblast Growth Factor8/10, BMP2/4: Bone Morphogenetic Protein2/4, Nkx2.5: NK homeobox5, GATA4/6: an GATA-DNA-Sequenz bindende Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, SRF: Serum Response Factor, Mef2C: Myocyte enhancing factor 2C, Tbx1/5/18: Tbox1/5/18, Hoxa1/a3/b1: Homöoboxgene a1/a3/b1, SMA: Smooth Muscle Actin, MHC: Myosin Heavy Chain, cTnT1: cardiac Troponin T1, MLC2v: Myosin Light Chain 2v ; modifiziert nach Abu-Issa und Kirby, 2007; Abb.1

### 3.1.7 Entstehung des Endokards

**Vaskulogenese:**  
De novo-Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen

Das initiale Ereignis intraembryonaler Vaskulogenese\* kennzeichnet die Etablierung des Endokards, der inneren Auskleidung des späteren Herzens (Drake und Fleming, 2000; Patan, 2000; Harris und Black, 2010).

Das Endokard rekrutiert sich aus kleinen Gruppen von Zellen, die bei der Maus zwischen E7 und E7.5, beim Huhn zwischen HH 5 und 8 in einer kraniokaudalen Welle von der ventralen Seite des viszeralen (zukünftigen kardiogenen) Mesoderms delaminieren (Viragh et al., 1989; De Ruiter et al., 1992; Sugi und Markwald, 1996). Diese Zellen werden aus dem myokardialen Kompartiment ausgeschlossen und entwickeln sich nach epithelio-mesenchymaler Transition über endotheliale zu endokardialen Zellen. Sie werden fortlaufend aussortiert und sammeln sich ventral nahe dem Entoderm (Linask und Lash, 1993; Drake und Fleming, 2000). Beim Vogel sind auch Zellen des Entoderms an der Bildung des Endokards beteiligt (Li et al., 2014).

Ausschlaggebend für diesen Vorgang sind vermutlich Signale aus dem Entoderm, die u. a. zu einer Herunterregulation des Zelladhäsionsmoleküls *N-Cadherin* im darüberliegenden Herzmesoderm führen (Linask und Lash, 1993).

Die anfänglich unregelmäßig dispergierten Zellen nehmen nachfolgend unter Zellformveränderung Verbindung zueinander auf, um Stränge zu bilden, die schließlich ein Lumen umgeben (Plexusbildung). Unter der Ventralfaltung der embryonalen Scheibe verschmelzen die großen Plexus der Schenkel des kardiogenen Mesoderms miteinander zum einheitlichen Endokardschlauch (Drake und Fleming, 2000; De Ruiter et al., 1992 und 1993; Hara et al., 2016).

Frühe Studien weisen bereits darauf hin, dass auch peripher der Herzfelder gelegene Regionen des viszeralen Mesoderms und des Kopfmesoderms an der Bildung des Endokards beteiligt sind (Noden, 1995).

Umstritten war lange Zeit die Frage nach einem gemeinsamen Ursprung des Endokards mit dem Myokard bzw. die Frage nach dem Zeitpunkt der Segregation beider Populationen.

Der Transkriptionsfaktor *MesP1* und das Zelloberflächenmolekül *Flk1*\* (Syn. *VEGR2-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) gelten als früheste gemeinsame Marker kardiovaskulärer Progenitoren im Primitivstreifen (Saga et al., 1999, 2000; Bondue et al., 2008).

Die Spezifikation der kardiovaskulären Progenitoren zu Proendokard bzw. genauer gesagt kardialen Hämangioblasten geht überwiegend bereits vor bzw. während der Gastrulation im Primitivstreifen vonstatten (Cohen-Gould und Mikawa, 1996; Wei und Mikawa, 2000; Milgrom-Hoffman et al., 2011; Lescroart et al., 2014). Mittlerweile ist das Endokard als Ort transienter Hämatopoese anerkannt (Nakano et al., 2013, 2016; Hu et al., 2017). Die Expression von *Tal1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia protein1*), das möglicherweise auch in die Migration dieser Zellpopulation eingebunden ist, hemmt ebenso wie der Transkriptionsfaktor *etsv2* die Differenzierung in Kardiomyozyten. Zwei verschiedene gewebsspezifische Enhancer von *Tal1* leiten die Entwicklung entweder in Richtung Angioblast oder Hämoblast (Schumacher et al., 2013; Van Handel et al., 2012; Hu et al., 2017). Das Membranglykoprotein *Endoglin* fördert durch Modulation der *Wnt*-und *BMP*-Interaktion auf nicht genau bekannte Weise die hämatopoietische Entwicklung kardiovaskulärer Vorläufer (Baik et al., 2016). Prospektive hämatopoietische Zellen zeichnen sich durch den Verlust der *Flk1*-Expression aus (Drake und Fleming, 2000; Busmann et al., 2007; Van Handel et al., 2012; Hu et al., 2017).

Im Verlauf der Reifung des Proendokards werden sukzessive die endothelialen Marker *PECAM*, *CD34*, *VE-Cadherin* und *Tie2* exprimiert, die *Tal1*-Expression herunterreguliert (Drake und Fleming, 2000).

Endokardzellen weisen sowohl Marker vaskulärer (Oberflächenmoleküle *Vascular Endothelial (VE)-Cadherin*, *PECAM-1*, Transkriptionsfaktoren *Etv2* und *Tal1*) als auch Marker myokardialer Differenzierung (Strukturproteine wie  $\beta$ -*Myosin heavy chain* ( $\beta$ *MHC*), *cardiac TroponinT* (*cTnT*), Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5*, *GATA4*, *Mef2C*) auf (Busmann et al., 2007; Harris und Black, 2010; Zamir et al., 2017). Das transkriptionale Netzwerk ähnelt dem der Hämangioblastprogenitoren, aus denen andere Endothelsubtypen entstehen, steht jedoch unter kardiogenetischer Kontrolle (*Nkx2.5*, *Islet-1*, *GATA4* und *5*), was der engen Nachbarschaft zum Myokard und der damit verknüpften molekularen Einwirkung geschuldet ist (Palencia-Desai et al., 2015). Der endotheliale und hämatopoietische Determinationsfaktor *Etv2* (Familie der *ETS* (*E-twenty six*)-Transkriptionsfaktoren) wird z.B. im Endokard direkt durch den herzspezifischen Transkriptionsfaktor *Nkx2.5* aktiviert (Ferdous et al., 2009). Er hemmt in endothelialen wie auch in endokardialen Zellen die Expression myokardialer Gene (Palencia-Desai et al., 2011). *NFATc1* (*Nuclear Factor of Activated T-cells 1*), ein endokardspezifischer Transkriptionsfaktor, wird direkt durch *Etv2* induziert und aktiviert synergistisch mit *GATA5* die endokardiale Genexpression im Mäuseembryo ab E 7.5 (De la Pompa et al., 1998; Nemer und Nemer, 2002; Palencia-Desai et al., 2011).

Wie beim Myokard spielt die korrekte Bildung und Verteilung von *Fibronectin* auch für die frühe Genese des Endokards eine wichtige Rolle (Astrof et al., 2007).

Endothel- und Endokardzellen teilen grundlegende molekulare und funktionelle Eigenschaften. Die Nähe zum Myokard und damit verbundene transkriptionale Unterschiede sowie die besonders ausgeprägte Fähigkeit von Endokardzellen zur molekularen Registrierung und Reaktion auf die starken und vielfältigen hämodynamischen Kräfte im Herzen, die ihnen eine herausragende Bedeutung für die Morphogenese des Myokards, die Valvulogenese, die Entwicklung des Erregungsleitungssystems, der Septen und der Koronargefäße geben, weisen das Endokard jedoch als besondere Subpopulation endothelialer Zellen aus (Bi et al., 1999;

**Flk1:** Fetal liver kinase 1; Oberflächenmarker kardiovaskulärer Vorläuferzellen, Expression geht bei Kardiomyozyten verloren

Misfeldt et al., 2009; Milgrom-Hoffman et al., 2011; Mickoleit et al., 2014; Hu et al., 2017; reviewed in Haack und Abdelilah-Seyfried, 2016).

## 3.2 Herzschleifenbildung

### 3.2.1 Grundlegendes Wissen und veraltete Vorstellungen

Das Herz ist das erste Organ im Embryo, das durch den im Englischen so anschaulich benannten Prozess des Loopings (auf Deutsch: Schleifenbildung) mit der bilateralen Symmetrie des Embryos bricht. In Folge dieses Prozesses etabliert sich einerseits die fundamentale Links-rechts-Asymmetrie des Herzens. Andererseits nähern sich Herzsegmente und die sich entwickelnden großen Gefäße ihren endgültigen topographischen Beziehungen zueinander an (Männer, 2000).

Die ursprünglich vorwiegend linear angeordneten Segmente werden als Voraussetzung für die Auftrennung in pulmonale und systemische Zirkulation parallel zueinander arrangiert.

Nach Ventralkrümmung des an Länge zunehmenden geraden Herzschlauchs rotiert dieser nach rechts. Die von ventral betrachtet C-förmig erscheinende Schleife geht in eine S-Form über. Zeitgleich verlagern sich die Atrien nach dorsal (Männer, 2000).

Durch progressive Vorwölbung der atrialen und ventrikulären Segmente verliert der Herzschlauch in dieser Entwicklungsphase seinen tubulären Charakter (Christoffels et al., 2000a; Rüsse und Sinowatz, 1998; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010).

Gegenwärtiges Lehrbuchwissen würdigt diesen zentralen Prozess der Kardiogenese unzureichend. Es basiert überwiegend auf veralteten Erkenntnissen und arbeitet mit ungeeignetem Bildmaterial, das ungeeignet erscheint, dem Leser die Prozesse buchstäblich „vor Augen zu führen“.

So wird die Entstehung der C-förmigen Herzscheife als reine Rechtsverlagerung ohne Rotation des gekrümmten Herzschlauchs interpretiert (Patten, 1922; Davis, 1927; Stalsberg, 1970). Diese Sichtweise ist inkorrekt und vernachlässigt die komplexen positionellen und morphologischen Veränderungen der einzelnen Segmente (Männer, 2000; Männer, 2004).

Ursächlich wird einzig auf die starke Verlängerung des Herzschlauchs im Kontrast zur engen Perikardhöhle verwiesen, ohne aber auf die Lateralität und andere bedeutsame topographische Aspekte einzugehen (Patten, 1922; Davis, 1927; Stalsberg, 1970; Sinowatz und Rüsse, 1998; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010).

Ebenso hinderlich ist in diesem Zusammenhang die überholte Darstellung des Herzschlauchs als Aneinanderreihung expandierter Segmente mit dazwischenliegenden Einschnürungen (so genannte „Segmenttheorie“, Benninghoff, 1923) (s.Kap.1 Abb.3). Sie missachtet, dass die Atrien nur dorsal und die Ventrikel nur an der Ventralseite expandieren und erschwert damit die Entwicklung eines plausiblen dreidimensionalen Konzepts vom Looping. Die „Ballontheorie“ von Moorman und Christoffels (2003) räumt mit alten Vorstellungen auf und präsentiert eine verständliche Darstellung dieser Vorgänge.

Während des Loopings bildet sich die äußere Umhüllung des Herzens, das Epikard (Lamina visceralis des Herzbeutels). Obgleich einige Forscher schon Anfang des 20. Jahrhunderts einen extrakardialen Ursprung des Epikards vermuteten (Kurkiewicz, 1909), beinhaltete das Dogma zur Entstehung des Epikards bis Mitte des letzten Jahrhunderts, dass es eine aus dem Myokard hervorgegangene und diesem lediglich als Schutzschicht dienende inerte Schicht sei. Man sprach und spricht auch noch in aktuelleren Lehrbüchern deshalb vom einheitlichen Epimyokard (Kölliker, 1879; McGready et al., 2006). Dieser Begriff ist abzulehnen, da sich das Epikard ab HH14 bzw. E9 aus einer stark proliferierenden Struktur am venösen Herzpol in der kaudalen Zölomwand generiert (Viragh und Challice, 1981; Männer, 1992; Mommersteeg et al., 2010).

Seine Bedeutung für die Kardiogenese ist wesentlich umfangreicher als früher angenommen wurde, weshalb das Epikard auch in folgenden Kapiteln immer wieder Erwähnung finden wird.

### 3.2.2 Auf dem Weg zur Asymmetrie

Die Etablierung der drei Körperachsen, antero-posterior, dorso-ventral und links-rechts, ist ein Vorgang von zentraler Bedeutung für die Organisation des Körperbauplans der Vertebraten.

Bevor nun das weitere Schicksal des geraden Herzschlauchs erörtert wird, erfolgt an dieser Stelle ein Einblick in die der Asymmetrie zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Dafür ist ein Zeitsprung in die Vergangenheit bis hin zur Gastrulation notwendig.

#### 3.2.2.1 Links-rechts-Asymmetrie

Das Herz ist das erste Organ im Embryo, das mit der bilateralen Symmetrie bricht. Die asymmetrische Morphogenese entlang der Links-rechts-Achse durchläuft drei aufeinanderfolgende Stufen: Als erstes kommt es zum Bruch mit der bilateralen Symmetrie des Embryos in Form asymmetrischer Genexpression, der sich am oder um den beim Huhn als Hensenknoten bezeichneten Primitivknoten herum vollzieht, also bereits während der Gastrulation (HH5; E6.5). Der zweite Schritt ist die „molekulare“ Übertragung der Asymmetrie am Primitivknoten auf das Seitenplattenmesoderm, welches das kardiogene Mesoderm mit einschließt. In der Folge etablieren sich unterschiedliche Genexpressionskaskaden im links-versus rechtsseitigen Seitenplattenmesoderm. Die dritte Stufe ist die asymmetrische Organogenese des Herzens ab ca. HH9/E8.5 (Mercola und Levin, 2001; Hamada et al., 2001, 2002).

Maus und Huhn weisen divergente Strategien bei der Etablierung der Links-rechts-Asymmetrie auf. Unterschiede existieren auch zwischen verschiedenen Säugetierspezies. Im Großen und Ganzen wurden bislang zwei Mechanismen identifiziert, die weitgehend äquivalente molekulare Signalwege nutzen. Allen bislang untersuchten Vertebraten ist zumindest die asymmetrische Expression von *Nodal* im Seitenplattenmesoderm, die der asymmetrischen Organogenese voraus geht, gemein (Levin et al., 1995; Lowe et al., 1996; Rebagliati et al., 1998; reviewed in Blum et al., 2009; reviewed in Campione und Franco, 2016).

Eine transiente Migration von Zellen des Hensenknotens um diesen herum von rechts nach links entgegen dem Uhrzeigersinn geht beim Hühnerembryo der asymmetrischen Expression vorher symmetrisch exprimierter Gene des Proteins *Sonic hedgehog* (*Shh*)\* und des Wachstumsfaktors *FGF8* voraus (Boettger et al., 1999; Dathe et al., 2002; Cui et al., 2009b; Gros et al., 2009).

Gleichzeitig bewirkt die Rotation der Zellen des Hensenknotens eine zunehmende rechtsdominante Expression des Zelladhäsionsmoleküls *N-Cadherin* um Primitivstreifen und Hensenknoten herum, was zur Beendigung der Zellmigration und Fixation der molekularen und morphologischen Links-Rechts-Asymmetrie führt (Garcia-Castro et al., 2000; Mendes et al., 2014).

Im Gegensatz zu einigen Säugern und vielen niederen Wirbeltieren sind beim Huhn keine Zilien für die Bewegung von Flüssigkeit und Zellen um den Hensenknoten herum verantwortlich (Blum et al., 2009, Review). Durch die asymmetrische Aktivität von Ionenpumpen, wie der H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und der H<sup>+</sup>-V-ATPase (spannungsabhängige Protonenpumpe) generierte Differenzen in der Membranspannung zwischen rechter und linker Seite des Primitivstreifens/Hensenknotens beeinflussen Flüssigkeitsbewegungen und Zelltransport und agieren somit stromaufwärts der asymmetrischen *Shh*-Expression (Levin et al., 2002; Aw et al., 2008).

**Sonic hedgehog:** extrazelluläres Protein, das über Zell-Oberflächen-Rezeptorbindung indirekt Einfluss auf die Expression ontogenetisch relevanter Gene nimmt

*ACVR2A* (*Activin-Rezeptor2A*) wird ab HH4 rechtsseitig im Hensenknoten exprimiert. *Activin*, ein der *Transforming Growth Factor*  $\beta$ -Familie zugehöriges sezerniertes Protein, das an diesen Rezeptor bindet, kontrolliert die rechtsseitige Expression von *BMP4* und *FGF8*, welche ihrerseits die Expression linksseitiger Gene, wie *Shh*, *Nodal* und *Pitx2* auf der rechten Seite hemmen (Boettger et al., 1999; Levin et al., 1995; Monsoro-Burq und Le Douarin, 2001; Katsu et al., 2013).

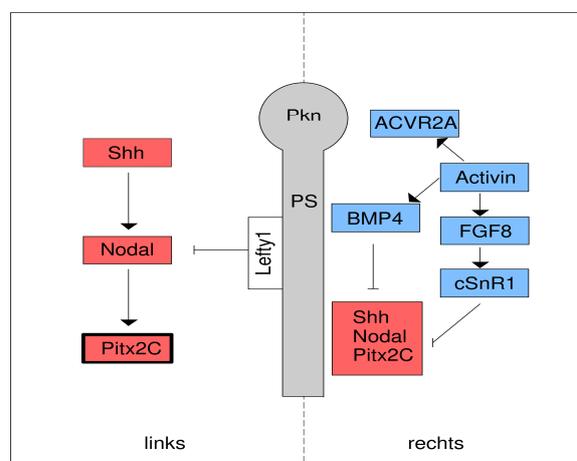
Der Wachstumsfaktor *FGF8* induziert ab HH8 *chick Snail-related gene1* (*cSnR-1*), das für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor der *Snail*-Familie kodiert, im rechten Seitenplattenmesoderm, welches vermutlich die Expression von linksseitigen Genen (*Nodal*, *Pitx2*) auf der rechten Seite hemmt (Isaac et al., 1997).

Ab HH5, mit beginnender Regression des Primitivstreifens und Entstehung der Chorda dorsalis in anteriorer Kontinuität, beschränkt sich die *Shh*-Expression auf die linke Seite des Hensenknotens. Trotz asymmetrischer Expression scheint *Shh* nur ein permissiver Faktor für die nachfolgende links asymmetrische *Nodal*-Expression im paraxialen Mesoderm zu sein. Die zunehmende morphologische Asymmetrie des Hensenknotens in dieser Phase spielt hierfür vermutlich die entscheidende Rolle. Ab HH8 dehnt sich die *Nodal*-Expression auf das linke Seitenplattenmesoderm aus (Tsikolia et al., 2012; Otto et al., 2014).

Proteine der *Cerberus/Dan*-Genfamilie hemmen nicht nur *BMP*-Expression im linksseitigen Hensenknoten, sondern fungieren vermutlich auch als Mediatoren der *Nodal*-Expression zwischen Hensenknoten und Seitenplattenmesoderm im Huhn (Katsu et al., 2012, 2013). Gleichzeitig verhindern sie eine Lateralisation von paraxialem und intermediärem Mesoderm durch *Nodal*-Antagonismus (Rodrigues-Esteban et al., 1999). *Nodal* ist nur vorübergehend aktiv und induziert die Expression von *Pitx2C*, einem Homöobox-Transkriptionsfaktor, der die Links-Rechts-Achseninformation aller inneren Organe permanent fixiert (Ryan et al., 1998).

Beim Huhn lässt sich also deutlich eine rechts- (*Activin*, *FGF8*, *BMP4*, *cSnR-1*) von einer linksseitigen (*Shh*, *Nodal*, *Pitx2C*) Genkaskade unterscheiden.

Die Mittellinie besitzt eine wichtige Funktion in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Links-rechts-Asymmetrie. Die Apoptose von Zellen in der Mittellinie, die zur Entstehung der Primitivgrube führt, verhindert die Zellmigration von links nach rechts über den Primitivstreifen und umgekehrt (Kelly et al., 2002). Molekular wird diese Barriere durch von *Nodal* induziertem *Lefty1*, einem links der Chorda exprimierten *TGF $\beta$* -Wachstumsfaktor und *Nodal*-Antagonisten, verkörpert (Ishimaru et al., 2000; Schlange et al., 2001) (s. Abb.18).



**Abb.18:** Induktion der asymmetrischen Genexpression an Primitivknoten (Hensenknoten) und Primitivstreifen beim Hühnerembryo ab HH5; die Genexpressionsmuster von linker (rot) und rechter Seite (blau) unterscheiden sich signifikant, linksseitige *Nodal*-Expression induziert die Links-Determinante *Pitx2C* (*Pituitary homeobox 2C*), rechts des Primitivstreifens wird diese Genkaskade durch *Activin*, *BMP4* (*Bone Morphogenetic Protein4*)

und *FGF8* (*Fibroblast Growth Factor8*) gehemmt; Pkn: Primitivknoten, PS: Primitivstreifen, Shh: Sonic hedgehog, ACVR2A: Activin-Rezeptor2A, cSNR1: chick Snail-related gene1, Pfeil: fördernder Einfluss, unterbrochener Pfeil: hemmender Einfluss; eigene Darstellung

Auch beim Säuger geht ein gerichteter Fluss extrazellulärer Flüssigkeit um den Primitivknoten (auch als posteriore Region der entstehenden Chorda dorsalis angesprochen) herum zwischen Epiblast und Entoderm der molekularen Links-rechts-Asymmetrie voraus, wobei es tierartspezifisch zwei unterschiedliche Strategien gibt. Bei Maus, Kaninchen und Mensch, deren Primitivknoten im Gegensatz zum Huhn von symmetrischer Form ist, wird der Flüssigkeitsstrom durch Zilien erzeugt (Nonaka et al., 1998, 2002; Okada et al., 2005; Blum et al., 2007; reviewed in Blum et al., 2009; Sugrue und Zohn, 2017).

Nach posterior geneigte, auf der Ventralseite des Primitivknotens zentral in der Knotengrube gelegene, motile Zilien (Mikrotubulus-basierte Primärzilien) generieren durch eine von ventral betrachtete Rotation im Uhrzeigersinn die Flüssigkeitsbewegung von rechts nach links (Nonaka et al., 1998; Okada et al., 2005; Nonaka et al., 2005; Singla und Reiter, 2006 Takamatsu et al., 2013).

**Situs inversus:**  
Abnormalität der Anatomie, bei der alle inneren Organe spiegelverkehrt angelegt sind

Bei Störung der Zilienmotilität kommt es bei Mensch und Maus in bis zu 50% der Individuen zur Ausprägung eines Situs inversus\* (Supp et al., 1997; Supp et al., 1999; Olbrich et al., 2002; Sugrue und Zohn, 2017).

*FGF8* triggert die Sekretion von *Shh* und *Retinsäure* enthaltenden Vesikeln aus den Zilientragenden Zellen des ventralen Primitivknotens. Die Bewegung der Flüssigkeit zur linken Seite führt dort zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren nach Kontakt mit den peripheren, immotilen, sensorischen Monozilien von Zellen an der linken Seite des Primitivknotens. Nachfolgend kommt es dort zur Aktivierung von Kalziumströmen (Tanaka et al., 2005). Diese wiederum beeinflussen neben dem Flüssigkeitsstrom selbst die Sekretion und Verteilung des ursprünglich symmetrisch produzierten Proteins *Cerl2* (*Cerberus-like protein 2*), eines *Nodal*-Antagonisten, negativ, sodass die asymmetrische Genkaskade unter linksseitiger *Nodal*-Dominanz ihren Anfang nimmt (Yoshida et al., 2012; Takao et al., 2013; Inacio et al., 2013). *Wnt3* ist in die Degradation der *Cerl2*-mRNA involviert (Kitajima et al., 2013; Nakamura et al., 2012). Der Transkriptionsfaktor *Pierce1* ist ebenfalls, aber auf noch unbekannte Weise an der Generierung der *Cerl2*-Asymmetrie beteiligt (Sung et al., 2016).

*Nodal*, der seine Transkription via autoregulatorischer Schleife selbst aktiviert und somit ständig verstärkt, „wandert“ dann vermutlich direkt zum linken Seitenplattenmesoderm durch Interaktion mit Co-Faktoren, wie *GDF1* (*Growth/Differentiation Factor1*, Wachstumsfaktor) und Komponenten der extrazellulären Matrix (Tanaka et al., 2007; Oki et al., 2007; Kawasumi et al., 2011). Ebenso ist die links-asymmetrische Übertragung von Calcium-Signalen über Gap junctions im Entoderm an der Manifestierung der Links-rechts-Asymmetrie im Seitenplattenmesoderm von Bedeutung (Viotti et al., 2012).

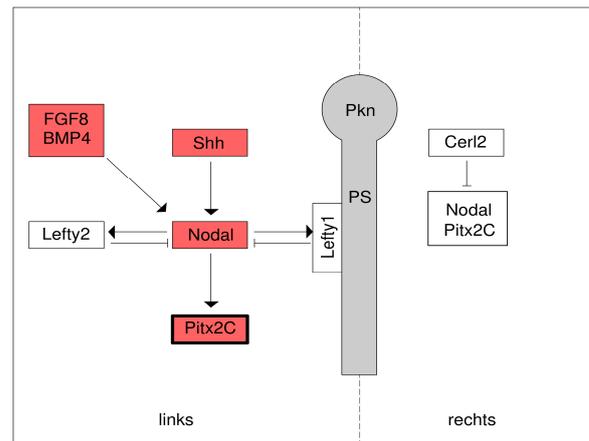
Das sezernierte Protein *Shh* scheint im Zusammenspiel mit *Retinsäure* auch eine Funktion für die Etablierung einer „molekularen Mittellinienbarriere“ in Form des linksseitig exprimierten Wachstumsfaktors und *Nodal*-Antagonisten *Lefty1* (*TGFβ*-Familienmitglied) zu besitzen (Tsukui et al., 1999). Darüberhinaus hemmt *Shh* die Expression von *Nodal* und *Pitx2C* auf der rechten Seite, ist also bei der Maus keine reine Links-Determinante (Meyers und Martin, 1999).

Durch *Nodal* und seinen Co-Faktor *GDF1* wird *Lefty1* in der Mittellinie aktiv. *Lefty2* dient der *Nodal*-Restriktion im linken Seitenplattenmesoderm. *Nodal* und *Lefty1/2* etablieren ein sogenanntes „self enhancement and lateral inhibition system (SELI)“ (Meno et al., 2001; Nakamura et al., 2006b).

Anders als beim Huhn agieren *FGF8* und auch *BMP4* bei der Maus als Links-Determinanten (Meyers und Martin, 1999; Fujiwara et al., 2002) (s. Abb.19).

Dies scheint jedoch beim Säuger kein konservierter oder Säuger-spezifischer Mechanismus zu sein, denn im Kaninchen wiederum ist *FGF8* wie im Huhn eine Rechts-Determinante. Eine

mögliche Ursache hierfür liegt in der Form des Keims, die bei Huhn und Kaninchen eine Scheibe, bei der Maus aber einen Zylinder darstellt (Fischer et al., 2002).



**Abb.19:** Induktion der asymmetrischen Genkaskade im Mäuseembryo ab E6.5; transiente links-dominante *Nodal*-Expression führt zur Aktivierung von *Pitx2C* (*Pituitary homeobox2C*) linksseitig des Primitivstreifens; Pkn: Primitivknoten, PS: Primitivstreifen, FGF8: Fibroblast Growth Factor8, BMP4: Bone Morphogenetic Protein4, Shh: Sonic hedgehog, Cerl2: Cerberus-like protein2, Pfeil: Aktivierung, unterbrochener Pfeil: Hemmung; eigene Darstellung

Bei Schwein und Rind hingegen sind keine Zilien vorhanden. Der Primitivknoten ist initial asymmetrisch wie beim Huhn und ventral von subchordalem Gewebe bedeckt, also ohne direkten Kontakt zum Dottersack, wie es bei Maus und Kaninchen der Fall ist, (Gros et al., 2009; Schroder et al., 2015). Entsprechend der Morphologie des Primitivknotens erfolgt die Sekretion von *Nodal* um ihn herum aus paranodalen Zellen bei Schwein und Rind (und Huhn) von Anfang an asymmetrisch, bei Maus und Kaninchen dagegen initial symmetrisch (Schroder et al., 2015).

Die *Nodal-Pitx2*-Kaskade ist evolutionär tief konserviert (reviewed in Nakamura und Hamada, 2012). Die Expression von *Pitx2C* dauert während der Organogenese in den Primordien fort (Ryan et al., 1998; Campione et al., 1999). Wie jedoch die durch *Pitx2C* kodierte asymmetrische Information von den Organanlagen interpretiert wird, ist noch weitgehend ungeklärt. Jedoch deutet Vieles darauf hin, dass *Pitx2C* maßgeblich in die Regulation des Zellzyklus eingebunden ist (Baek et al., 2003; Yashiro et al., 2007; Tessari et al., 2008; reviewed in Campione und Franco, 2016).

Während *Pitx2C*-Deletion beim Huhn zur Randomisierung der Looping-Richtung kommt, ist dieser Prozess trotz verschiedener Fehlbildungen bei Maus-*Pitx2C*-Nullmutanten nicht beeinträchtigt (Lu et al., 1999; Linask et al., 2002; Liu et al., 2002). *Pitx2C* kontrolliert zumindest bei der Maus nicht alle Aspekte der Lateralität. Bei veränderter Expression, z.B. rechts statt links, kommt es jedoch zu Seitendefekten wie Situs inversus oder Heterotaxie\* (Ryan et al., 1998).

Auch die teils in Folge einer differentiellen *Retinsäure*-Sensitivität von rechts- vs. linksseitigem Herzmesoderm asymmetrische Expression extrazellulärer Matrixproteine, wie *JB3*, *hLAMP* und *Flectin* oder auch *Matrix Metalloproteinen*, beeinflusst die asymmetrische Morphogenese des Herzens (Smith et al., 1997; Tsuda et al., 1998; Linask et al., 2003; Perles et al., 2015; Guimier et al., 2015).

**Heterotaxie:** Fehlbildung der Anatomie, bei der einzelne innere Organe spiegelverkehrt angelegt sind, oft mit funktionellen Beeinträchtigungen verbunden

### 3.2.2.2 Ausbildung der antero-posterioren Identität des Herzens

Die Etablierung der antero-posterioren Achse im Embryo erfolgt durch Signalmoleküle, die durch einen signifikanten antero-posterioren Gradienten charakterisiert sind.

Bei der Maus wird die zunächst proximo-distale Achse des Eizylinders durch die Entstehung des viszeralen Entoderms aus Epiblastzellen von distal nach proximal in die definitive antero-posteriore Achse konvertiert (Kimura-Yoshida et al., 2005). Dabei spielen externe/maternale mechanische Faktoren, die erst die für die Migration der Epiblastzellen erforderliche Lockerung der Basalmembran ermöglichen, eine unabdingbare Rolle (Hiramatsu et al., 2013). Der im späten Blastula-Stadium in posterioren Epiblastzellen exprimierte Wachstumsfaktor *Nodal* und der kanonische *Wnt*-Signalweg bzw. deren nachfolgende Hemmung sind maßgeblich in die initiale Spezifikation der antero-posterioren Achse involviert. Die Zellen des Epiblasten scheinen der Signalquelle zu „entfliehen“, was mit der Elongation des Keims einhergeht (Brennan et al., 2001; Norris et al., 2002; Kimura-Yoshida et al., 2005; Yamamoto et al., 2009; Stuckey et al., 2011a und b).

Nach der Gastrulation spielt das Signalmolekül *Retinsäure* eine wichtige Rolle für die Festlegung der antero-posterioren Identität. Bereits vor über 50 Jahren erkannte man die dramatischen Effekte bei Überschuss oder Defizienz von Vitamin A, des Retinsäurevorläufers, auf die Herzentwicklung (Wilson und Warkany, 1949; Wilson et al., 1953). Mit seinem deutlichen postero-anterioren Gradienten kontrolliert *Retinsäure* konzentrationsabhängig zahlreiche Gene, die zur Ausprägung antero-posteriorer Muster im Herzschlauch notwendig sind (Ross et al., 2000; Sirbu et al., 2008; Bertrand et al. 2011).

*Retinaldehyd-Dehydrogenase2 (RALDH2)*, das Schlüsselenzym der endogenen *Retinsäure*-Produktion, wird bei Huhn und Maus kurz nach der Gastrulation (HH6, E7.5) im posterioren Mesoderm und im geraden Herzschlauch in den posterioren Regionen exprimiert (Niederreither et al., 1999; Xavier-Neto et al., 2000). *RALDH2*- Gendefekte beeinträchtigen selektiv die Entwicklung der posterioren Herzsegmente, also der Atrien und des Sinus venosus, ohne jedoch die Differenzierung der Kardiomyozyten zu beeinflussen (Niederreither et al., 2001, 2002; Ryckebusch et al., 2008). Ein Überschuss an *Retinsäure* wiederum verursacht eine „Posteriorisation“ des Herzschlauchs mit anteriorer Ausdehnung der Expressionsdomänen „posteriorer“ Gene wie *T-box5 (Tbx5)* und *Atrial Myosin Heavy Chain (AMHC)*, atrien-spezifisches Strukturprotein) sowie gestörter Entwicklung von Ventrikeln und Ausflusstrakt (Osmond et al., 1991; Yutzey et al., 1994; Xavier-Neto et al., 1999). *Retinsäure* steuert unter Mitwirkung von *GATA4* selbst die Expression seiner unterschiedlichen nukleären Rezeptoren (Feng et al., 2012).

Der unter direkter Kontrolle von *Retinsäure* stehende Transkriptionsfaktor *Tbx5* wird ebenfalls in einem postero-anterioren Gradienten exprimiert. Bei *Tbx5*-Defizienz kommt es zu schwerer Hypoplasie von Atrien und linksventrikulärem Kompartiment (Bruneau et al., 2001b).

Die von der *Retinsäure*-Konzentration abhängige Induktion der Homöoboxgene\* *Hoxb1*, *Hoxa1* und *Hoxa3* (von anterior nach posterior) im Zweiten Herzfeld, die ihrerseits verschiedene Herzvorläufer-Subpopulationen definieren, unterstreicht die Bedeutung von *Retinsäure* für die Spezifikation der antero-posterioren Achse des Herzens (Bertrand et al., 2011).

**Homöoboxgene:**  
Gruppe von morphogenetisch bedeutsamen Genen, die eine spezifische, für einen Transkriptionsfaktor kodierende Sequenz von Genen, die Homöobox, enthalten

### 3.2.2.3 Dorso-ventrale Musterbildung des Herzschlauchs

Während der Herzschleifenbildung werden die Ventralseite der Ventrikelregion und die Dorsalseite der atrialen Region zur äußeren Krümmung (S-Schleife). Ausgehend von dieser expandiert und differenziert sich das zukünftige Arbeitsmyokard von Atrien und Ventrikeln. Die Grundlage dafür bildet eine integrierte antero-posteriore und dorso-ventrale Musterbildung (Moorman und Christoffels, 2003).

Bei der Maus wird der Transkriptionsfaktor *eHAND* am E8-8.5 spezifisch im Myokard der Ventralseite des linearen Herzschlauchs exprimiert (Biben und Harvey, 1997; Thomas et al., 1998; Srivastava, 1999). Nach dem Looping ist seine Expression begrenzt auf die linke Seite

des Atrioventrikular-Kanals (ehemals ventrale Seite im geraden Herzschlauch), die äußere Krümmung des linken Ventrikels und den Ausflusstrakt (Firulli et al., 1998; Thomas et al., 1998). Er zeigt also sowohl ein antero-posteriores als auch ein deutlich dorso-ventral betontes Expressionsmuster und ist zudem unerlässlich für die Expansion der Kammerwände, indem er die Proliferation des Myokards fördert (Togi et al., 2004; McFadden et al., 2005; Risebro et al., 2006).

Im Gegensatz dazu wird *eHAND* beim Huhn vor, während und nach dem Looping im gesamten Herzen exprimiert (Srivastava et al., 1995 und 1999).

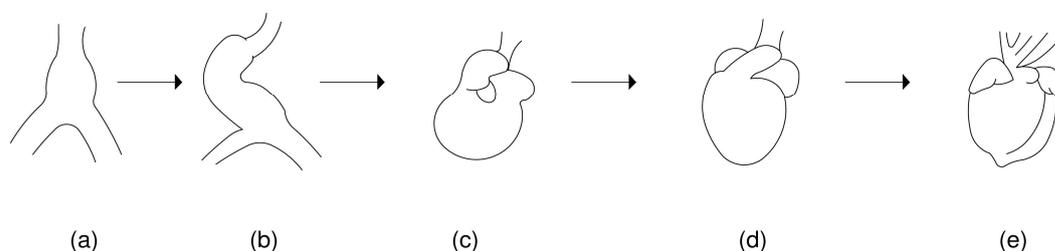
Kurz nach Beginn der Schleifenbildung wird *ANF* (*Atrialer Natriuretischer Faktor*), ein spezifischer Marker von Arbeitsmyokard (das Myokard der späteren Atrien und Ventrikel) an der Ventralseite des Herzschlauchs exprimiert (Christoffels et al., 2000a; Houweling et al., 2002).

Die stark zunehmende Komplexität der topographischen Verhältnisse des Herzschlauchs machen eine Zuordnung der Genexpressionsmuster zu dorsal resp. ventral mit Fortschreiten des Herzlooping unmöglich. Eine differenzierte Darstellung der genetischen Basis für die weitere Differenzierung des Myokards erfolgt daher erst im Abschnitt 3.

### 3.2.3 Phasen der Herzschleifenbildung

Die dem Herzlooping zugrunde liegenden morphogenetischen Prozesse, die am ausführlichsten beim Huhn untersucht wurden, können in vier Phasen gegliedert werden:

- (1) Das C- oder Dextrallooping von HH10-12, bei dem der gerade Herzschlauch in eine C-förmige Schleife transformiert, deren Konvexität in der Ventralansicht normalerweise nach rechts ausgerichtet ist.
- (2) Während des frühen S-Loopings von HH13-18 entsteht aus der C-Form unter Verkürzung des Abstands zwischen arteriellem und venösem Pol eine sogenannte unreife S-Schleife.
- (3) In der Phase des späten S-Looping (HH19-24) verschieben sich der proximale Ausflusstrakt nach links und der Atrioventrikularkanal nach rechts. Die atrialen und ventrikulären Segmente beginnen, sich deutlich aus dem Herzschlauch hervorzuwölben.
- (4) Die letzte Phase von HH25-34 wird als Herzseptierung bezeichnet und ist gekennzeichnet durch Unterteilung des Herzens mittels Scheidewänden in verschiedene Kompartimente, was die vollständige Trennung von pulmonaler und systemischer Zirkulation zur Folge hat (siehe Abb.20).



**Abb.20:** Phasen der Herzschleifenbildung: a- gerader Herzschlauch, b- C-Schleife, c- frühe S-Schleife, d- späte S-Schleife, e- reifes Herz mit vier separierten Kammern; modifiziert nach Männer, 2004, Abb.1

Die Herzschleifenbildung wird durch verschiedene Untersucher sehr unterschiedlich definiert. Während einige Autoren sich nur auf das Dextrallooping beschränken (Stalsberg, 1970; Olson und Srivastava, 1996), beziehen andere die S-Phasen mit ein (Patten, 1922; De la Cruz et al.,

1989; Männer et al., 1993; Taber, 1998). Wieder andere Autoren ordnen auch die Septierung als Bestandteil des Loopings ein (Kirby und Waldo, 1995; Bouman et al., 1995, 1997). Im vorliegenden Text bezieht sich der Begriff Herzlooping auf die Phasen (1) bis (3), da in der letzten Phase (4) keine signifikanten Konfigurationsveränderungen des Herzschlauchs mehr vorstatten gehen bzw. dieser nicht mehr als tubuläre Struktur zu erkennen ist.

### 3.2.4 Morphogenese und Ursachen/Mechanismen

#### 3.2.4.1 C-Looping

Ausgangspunkt für die Herzschleifenbildung ist der gerade, fast bilateral symmetrische, dorsal z. T. noch offene Herzschlauch, der sich entlang der ventralen Mittellinie des Embryos orientiert. Dorsal davon liegt der neugebildete Vorderdarm, mit dem der Herzschlauch via dorsalem Mesokard verbunden ist (Männer, 2000).

Der in der Perikardhöhle gelegene Herzschlauch besteht von innen nach außen aus einschichtigem Endokard, einer dickeren Schicht extrazellulären Materials, der Herzgallerte, und dem zweischichtigen Myokard. Er enthält die Primordien der apikalen trabekulären Region der zukünftigen Ventrikel sowie Teile benachbarter Regionen. Mit seinen paarigen venösen Schenkeln am Kaudalende, die sich fortsetzen in die venösen Zuflüsse (Venae vitellinae), „reitet“ er auf der anterioren Darnpforte. Kranial erhält er Verbindung zum Aortensack und den neu entstehenden Kiemenbogenarterien (Männer, 2000; Mjaatvedt et al., 2001; Zaffran et al., 2004).

Durch das Hinzufügen weiterer Segmente an beiden Herzpolen aus dem Zweiten Herzfeld kommt es während der Schleifenbildung zur Elongation des Herzschlauchs und zum vollständigen Schluss der Dorsalseite durch die Fusion der dorsalen Mesokardfalten (Männer, 2000; Cai et al., 2003; Mjaatvedt et al., 2001; Zaffran et al., 2004; Galli et al., 2008).

Zu Beginn des C-Loopings beim Huhn zwischen Stadium HH9 und 10 (Maus E8.5-9) ist das ventrale Mesokard, welches bei der Maus nur kurzzeitig existiert, fast vollständig verschwunden. Die Kontraktion der Kardiomyozyten und ein noch irregulärer Blutfluss setzen zu diesem Zeitpunkt ein. Der linksseitige Marker *Pitx2C* wird im Herzschlauch während aller Looping-Phasen auf dessen linker Seite exprimiert. Abgesehen von einer leichten kranio-kaudalen Verlängerung des Herzschlauchs weist sein in einer Bifurkation mündendes kaudales Ende einen größeren Durchmesser als sein kraniales Ende auf. Dies ist das erste Zeichen einer morphologischen Differenzierung in kaudalen Ventrikelteil und kranialen Ausflussteil (De la Cruz et al., 1989; Ryan et al., 1998; Männer, 2000).

Weiterhin erscheint ein bilateral symmetrisches Paar von seitlichen Furchen, die die Grenze zwischen den Primordien der apikalen Regionen von zukünftigem linken und rechten Ventrikel markieren. Als erste Andeutung der zunehmenden Asymmetrie flacht sich die rechtslaterale Furche ab, wohingegen sich ihr linkes Gegenstück vertieft (De la Cruz et al., 1989; Männer, 2000).

Unter weiterer Verlängerung des primitiven Ventrikelsegments krümmt sich dieses nach ventral. Simultan erfolgt die Rotation/Torsion um die kranio-kaudale Achse entgegen dem Uhrzeigersinn von einer stromabwärts gelegenen Position aus betrachtet. Sie führt zur Entstehung einer helikal gewundenen Schleife, deren Konvexität von ventral betrachtet nach rechts weist. Die ehemals ventrale Seite des geraden Herzschlauchs wird zur konvexen äußeren Krümmung. Die Dorsalseite wird zur konkaven inneren Krümmung. Die ursprünglich rechte und linke Seite werden zur Dorsal- resp. Ventralseite des gewundenen Herzschlauchs (De la Cruz et al., 1989; Männer, 2000) (siehe Abb.22 a-d). Terminologisch richtig handelt es sich hierbei um eine linksgewundene Helix.

Während der Rotation bildet sich auch zwischen Ventrikelteil und Ausflussteil (Conus) eine transiente Furche, der Sulcus conoventricularis. Ab HH12 kommt es zur internen Torsion des

Ausflusstrakts entlang seiner kraniokaudalen Achse und zum „Abknicken“ mit Rechtsverlagerung. Durch Entstehung eines Winkels lassen sich an dieser Stelle bereits proximaler (Bulbus cordis) und distaler Ausflusstrakt (Conus arteriosus) des Herzschlauchs unterscheiden.

Bei HH11+/12 erscheint das Primordium der primitiven atrialen Region kaudal der Ventrikelkrümmung (Castro-Quezada et al., 1972; Männer, 2000).

Am Ende des C-Loopings lassen sich am noch schlauchförmigen Herzen drei Regionen unterscheiden: (1) das primitive Atrium, (2) der Ventrikelteil, bestehend aus atrioventrikulärem Segment und den apikalen trabekulären Regionen von linkem und rechtem primitiven Ventrikel, und (3) der primitive Ausflusstrakt (Männer, 2000).

Eine Reihe verschiedener Theorien versucht seither, die Ursachen für diese Vorgänge zu ergründen. Übereinstimmung herrscht zumindest darin, dass die erste Phase des C-Looping, die Ventralkrümmung, ein intrinsischer, also von äußeren Kräften unabhängiger Prozess ist. Die nachfolgende Torsion hat sowohl intrinsische als auch extrinsische Ursachen.

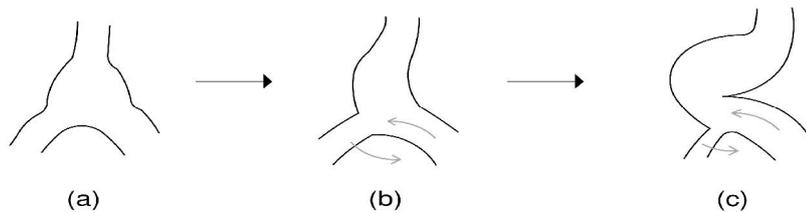
Bei der Ventralkrümmung vermutete man als Ursache das „Anschwellen“ des Herzschlauchs durch Zunahme der Herzgallerte mit dorsal durch das Mesokard beschränkter Streckung (Manasek et al., 1984; Baldwin und Solursh, 1989), differentielles hyperplastisches (mit ventraler Betonung) Wachstum des Herzschlauchs (Stalsberg, 1969), differentielle zytoskelettale Kontraktionen im Herzschlauch (Itasaki et al., 1991), sowie differentielle myokardiale Zellformveränderungen (Manasek et al., 1972; Latacha et al., 2005; Auman et al., 2007). Eine jüngere Studie von Shi et al. (2014) bestätigt die differentielle Zellformveränderungshypothese, sieht aber weder differentielle Aktinpolymerisation noch Hyperplasie, sondern differentielle Hypertrophie als führenden Mechanismus und bestätigt damit die Studien von Auman et al. (2007), Soufan et al. (2006) und Remond et al. (2006). Die Größe der Kardiomyozyten nimmt also von der Dorsalseite (zukünftige innere Krümmung) des geraden Herzschlauchs zur Ventralseite (zukünftige äußere Krümmung) hin zu. Ursachen dafür werden jedoch nicht ins Feld geführt. Man schließt aber nicht aus, dass auch einige der vorher benannten Mechanismen eine additive und/oder redundante Rolle spielen, wodurch der Prozess stabilisiert wird (Shi et al., 2014).

Die torsionale Komponente des C-Looping, die sich in der S-Phase fortsetzt, ist ein überwiegend von externen Kräften gesteuerter Prozess.

Die kompressive Belastung, die von ventral auf den gekrümmten und sich weiter verlängernden Herzschlauch durch die Perikardhöhle ausgeübt wird, scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (Voronov und Taber, 2002; Voronov et al., 2004; Nerurkar et al., 2006; Ramasubramanian et al., 2008; Taber et al., 2010; Ramasubramanian et al., 2013; Bayraktar und Männer, 2014; Shi et al., 2014).

Für die Richtung der Torsion ist wahrscheinlich eine von Beginn an bestehende, genetisch programmierte und auf asymmetrischer Zellproliferation im Zweiten Herzfeld beruhende Asymmetrie des geraden Herzschlauchs verantwortlich. Am kranialen Herzpol ist nämlich der Zellbeitrag vom rechten präkardialen Mesoderm größer als der des linken, wohingegen am kaudalen Herzpol der Zellbeitrag vom linken präkardialen Mesoderm dominiert (Stalsberg, 1970; Linask et al., 2005). Diese morphologische Asymmetrie korrespondiert und steht in direktem Zusammenhang mit der durch die *Shh-Nodal-Pitx2C* regulierte asymmetrische Expression von *Flectin* (Protein der extrazellulären Matrix) im Herzschlauch (Tsuda et al., 1998; Linask et al., 2002 und 2003; Kidokoro et al., 2008).

Der linke Teil des Einflusstrakts im Bereich der Bifurkation ist demnach größer als sein rechtes Gegenstück und wird von ventral durch die innere Auskleidung der Perikardhöhle nach rechts-kranial gedrückt. Dadurch wird der rechte Einflusstrakt nach links-kaudal verlagert, was eine partielle Rotation des Einflusstrakts entgegen dem Uhrzeigersinn bewirkt (Voronov et al., 2004; Kidokoro et al., 2008; Taber et al., 2010) (siehe Abb.21).



**Abb.21:** Rotation des Einflusstrakts, Ventralansicht: der linke größere Schenkel des Einflusstrakts drückt nach rechts-kränial, wodurch der rechte kleinere Schenkel nach links-kaudal rotiert; modifiziert nach Kidokoro et al., 2008, Abb.1

### 3.2.4.2 Frühes S-Looping

Die folgende Phase (HH13-18) enthält zwei bedeutende morphogenetische Ereignisse: zum einen die Verkürzung des Abstands zwischen dem arteriellen und dem venösen Pol des gekrümmten Herzschlauchs und zum anderen die Verschiebung der primitiven Ventrikelkrümmung von seiner ursprünglichen Position kranial des primitiven Atriums nach kaudal davon. Diese Prozesse werden begleitet von a) dem Erscheinen des Sinus venosus am kaudalen Herzpol bei HH14, b) der Verlagerung des Sinus venosus von seiner Position kaudal der Atrien in seine endgültige Lage dorsal der Atrien von HH14 bis HH18, c) der Ruptur und dem Verschwinden des dorsalen Mesokards (HH13-14) außer an kranialem und kaudalem Herzpol, d) den lateralen Aufweitungen der atrialen Region (HH14-18), e) dem Verschwinden der linkslateralen Furche (HH18) und f) dem generellen Wachstum des Herzschlauchs (Männer, 2000).

Durch gerichtete peristaltische Kontraktion setzt ein regulärer, laminarer Blutfluss ein (Kozlovsky et al., 2016).

Eine bedeutende Folge dieses Vorgangs ist auch, dass zukünftiger linker und rechter Ventrikel nun nicht mehr in einer kaudokränialen Richtung angeordnet sind, sondern, wie es der endgültigen und terminologischen Konfiguration entspricht, der rechte Ventrikel rechts des linken Ventrikels vice versa (Männer, 2000) (siehe Abb.22 e-g).

Bei HH18 lassen sich vier Komponenten am S-förmigen Herzschlauch unterscheiden: 1) der Sinus venosus, 2) die primitiven Atrien mit seitlichen Aufweitungen, 3) die Ventrikelkrümmung, bestehend aus atrioventrikulärer Verbindung und den expandierenden apikalen trabekulären Regionen der zukünftigen Ventrikel, 4) der primitive Ausflusstrakt, an dem sich eine vertikale proximale Region von einer horizontalen distalen Portion unterscheiden lässt (De la Cruz et al., 1989; Männer, 2000).

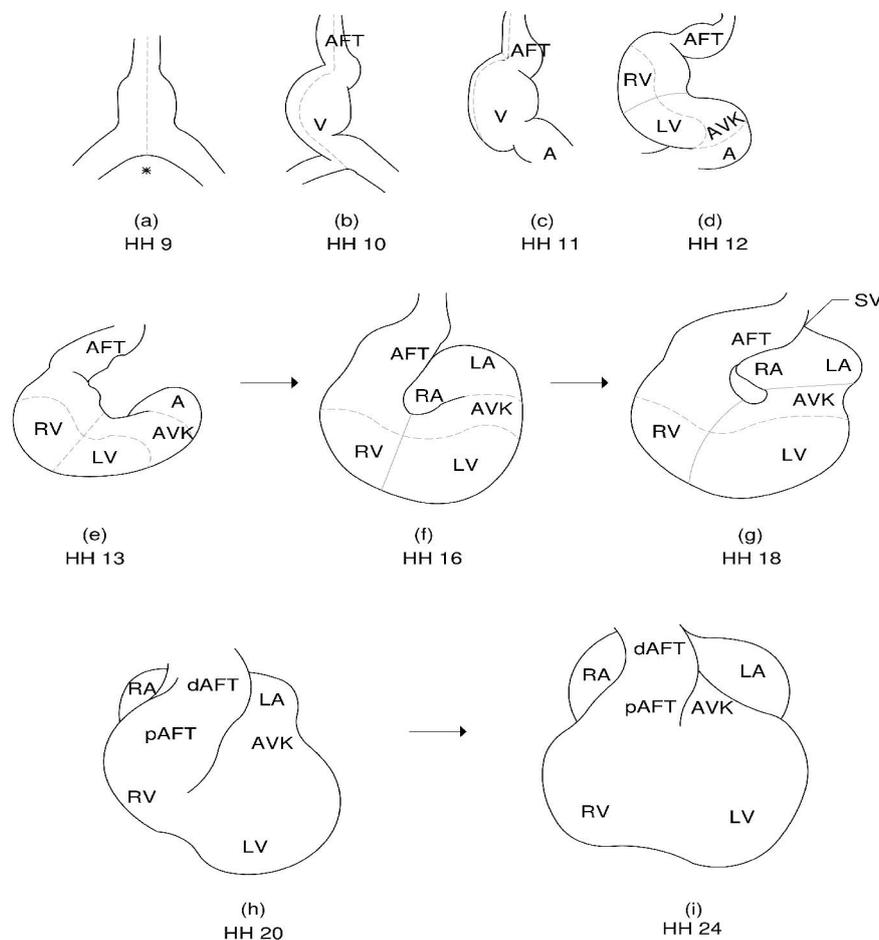
Ursächlich für die beschriebenen Konfigurationsveränderungen ist das kontinuierliche Wachstum des an beiden Polen fixierten Herzschlauchs in Zusammenspiel mit der kompressiven Belastung durch die räumliche Begrenzung innerhalb der Perikardhöhle (Voronov et al., 2004; Taber et al., 2010; Ramasubramanian et al., 2008; Bayraktar und Männer, 2014).

Die Degradation des dorsalen Mesokards ermöglicht die maximale Torsion des Herzschlauchs (Linask et al., 2005; Taber et al., 2010).

Die Flexion der embryonalen Kopfstrukturen, insbesondere der prospektiven Halsregion ist ein weiterer maßgeblicher extrinsischer Faktor für das S-Looping. Sie führt zum weiteren Zusammendrängen der helikalen Struktur des Herzschlauchs (Patten, 1922; Butler, 1952; Manning und McLachlan, 1990; Männer et al., 1993 und 1995; Ramasubramanian et al., 2013).

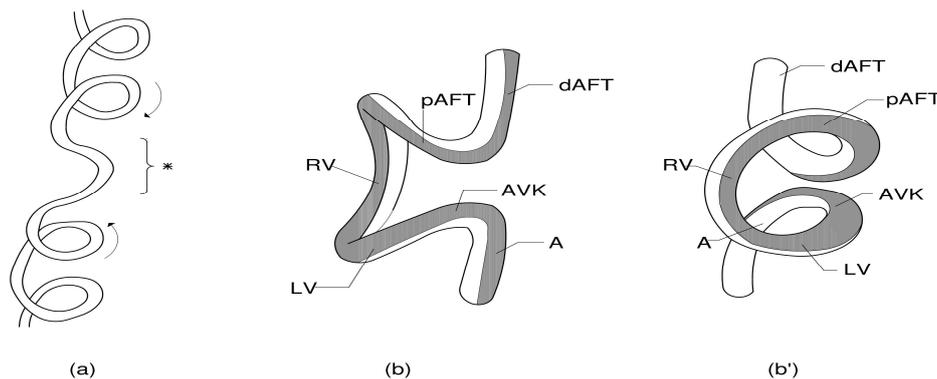
### 3.2.4.3 Spätes S-Looping

In dieser Phase von HH19 bis HH24, die man auch als teilweises „Entwinden“ des Herzens um seine basoapikale Achse beschreibt, erscheinen erstmals die Anlagen der großen Arterienstämme im distalen Ausflusstrakt des Herzens. Außerdem kommt es zur Ventral-Verlagerung des rechten Ventrikels und zur Ventral- und Links-Verschiebung des proximalen Ausflussteils von rechts der Atrien nach ventral des rechten Atriums. Dabei vollzieht der Atrioventrikularkanal eine Rechts-Verlagerung. Dieser Vorgang bringt Atrioventrikularkanal und Ausflussteil in eine Ebene. Gleichzeitig setzt sich das Wachstum des Herzschlauchs fort mit beträchtlicher Ausdehnung der Ventrikelkrümmung und der Atrien, wodurch letztlich der tubuläre Charakter des Herzens verloren geht (Männer, 2009) (siehe Abb.22 h,i).



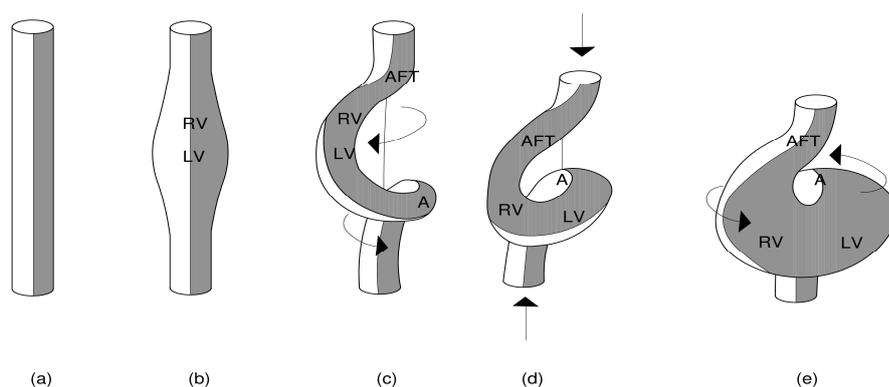
**Abb.22 Bildtafel Looping beim Hühnerembryo von Hamburger-Hamilton-Stadium (HH) 9-24:** a-d: C-/Dextrallooping Huhn: Ventralansicht der konsekutiven Phasen im C-Looping, die gestrichelte Linie markiert die Mittellinie des Herzschlauchs, \*- anteriore Darmöffnung, AFT - gemeinsamer Ausflusstrakt, V - primitiver Ventrikelbereich, später RV/LV - rechter/linker Ventrikel, A - gemeinsames primitives Atrium, AVK - Atrioventrikularkanal; e-g: Frühes S-Looping: auffällig ist die Verkürzung des Abstands zwischen arteriellem Pol und venösem Pol, RA - rechtes Atrium, LA - linkes Atrium, der sich kaudal an die Atrien anschließende Sinus venosus (SV) ist von diesen überlagert; h,i: Spätes S-Looping: Linksverlagerung des Ausflusstrakts (AFT, jetzt unterteilt in distalen (dAFT) und proximalen (pAFT) Ausflusstrakt) und Rechtsverlagerung von Atrien und Atrioventrikularkanal werden begleitet von der Ventralpositionierung des rechten Ventrikels sowie dem allgemeinen Wachstum der Vor- und Hauptkammern; modifiziert nach Männer, 2000, Abb.1 und Abb.3/4 und Männer, 2009; Abb.9

Der „Wiederentdecker“ des helikalen Konzepts, Jörg Männer, präsentierte 2013 eine auf seinen Gummischlauch-Experimenten (Männer, 2004) basierende aufschlussreiche biophysikalische Erklärung für das S-Looping-Phänomen. Die aus dem C-Looping hervorgehende entgegen dem Uhrzeigersinn helikal gewundene Schleife wird im S-Looping durch eine komplementäre Windung ausgehend vom venösen Herzpol ergänzt. Diese als helikale Verdrehung (engl.: helical perversion) bezeichnete geometrische Struktur, die sich auch in Ranken von Kletterpflanzen und Telefonkabeln wiederfindet, führt zur Verminderung der Spannung innerhalb helikaler Objekte, die an zwei Enden fixiert sind und weiter wachsen (Domokos und Healey, 2005; Männer, 2013). Eben diese Konstellation trifft auch auf den Herzschlauch zu und repräsentiert die „optimale geometrische Lösung für das Form-Problem“ der Herzschleife während des Loopings (Männer, 2013) (siehe Abb.23).



**Abb.23:** Konzept der helikalen Verdrehung, a - am Beispiel der Ranke einer Kletterpflanze, Pfeile zeigen die Richtung der helikalen Windungen an, \* markiert den Bereich der helikalen Verdrehung; b - schematische Darstellung der helikalen Verdrehung am Herzschlauch in der Ventralansicht und b' - in der rechtslateralen Ansicht, A - Atrienregion, AVK - Atrioventrikularkanal, LV - linker Ventrikel, RV - rechter Ventrikel, pAFT/ dAFT - proximaler/distaler Ausflusstrakt; modifiziert nach Männer 2013, Abb.7/8

In wie weit hierbei auch die allgemeine Wachstumsdynamik des Herzschlauchs und Blutfluss-bedingte Kräfte eine Rolle spielen, ist bislang unzureichend untersucht worden (Männer, 2004; Männer, 2013).



**Abb.24:** Übersichtsschema Herzlooping in der Ventralansicht, die ursprünglich linke Seite des geraden Herzschlauchs ist grau unterlegt: a - gerader Herzschlauch, b - Ventralkrümmung, c - Dextral-Looping, d - frühes S-Looping, e - spätes S-Looping, A - Atrienregion, LV - linker Ventrikel, RV - rechter Ventrikel, AFT - Ausflusstrakt; modifiziert nach Männer, 2009, Abb.8

### 3.2.5 Herausbildung der Herzkammern während des Loopings

#### 3.2.5.1 Arten des Myokards

Das primäre, „primitive“ Myokard des geraden Herzschlauchs zeichnet sich aus durch relativ kleine Zellen, schwache Proliferationsfähigkeit, geringe Kontraktilität, geringe Erregungsleitungsgeschwindigkeit, jedoch hohe Automatizität (Syn.: intrinsische Aktivität oder Schrittmacheraktivität). Automatizität umschreibt die Fähigkeit, einen intrinsischen Zyklus elektrischer Aktivität zu generieren, der zur Kontraktion führt (Canale et al., 1986; Eckert et al., 1988).

Die von Zellen des venösen Herzpols dominierte Schrittmacheraktivität sowie die geringe Impulspropagation sind unabdingbare Voraussetzungen für die relativ langsamen peristaltischen Kontraktionswellen des geraden Herzschlauchs (Van Mierop, 1967; Paff et al., 1968).

Die Entwicklung von der Apex zur Basis aktivierter, synchron kontrahierender Herzkammern erfordert jedoch höhere Kontraktilität und Leitungsgeschwindigkeit des depolarisierenden Impulses. Diese Eigenschaften erfüllt das Arbeitsmyokard der Atrien und Ventrikel, das sich im Laufe des Loopings aus dem Herzschlauch hervorwölbt. Dieses verdrängt zunehmend das primäre Myokard (Myokard des ursprünglichen Herzschlauchs), dessen Überreste die Grundlage für die Entstehung des Erregungsleitungssystems und der Herzklappen bilden (Canale et al., 1986; Christoffels et al., 2000a; Soufan et al., 2006; Christoffels und Moorman, 2009).

Das sogenannte Arbeitsmyokard entsteht an der äußeren Krümmung des Herzschlauchs aus primärem Myokard und ist gekennzeichnet durch relativ große Zellen, starke proliferative Aktivität, hohe Kontraktilität, hohe Erregungsleitungsgeschwindigkeit, jedoch gering ausgeprägte intrinsische Aktivität (Canale et al., 1986; Christoffels et al., 2000a; Soufan et al., 2006).

Die differenzielle regionale Morphogenese führt zur Zunahme der Größe von Vorhöfen und Hauptkammern. Gleichzeitig bereitet die Erhöhung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit den Weg für die Umstellung des peristaltischen Kontraktionsmusters im geraden Herzschlauch auf das endgültige apiko-basale Kontraktionsmuster (Erregung und Kontraktion von der Herzspitze zur Herzbasis hin) des reifen Herzens (Paff et al., 1968; De Jong et al., 1992).

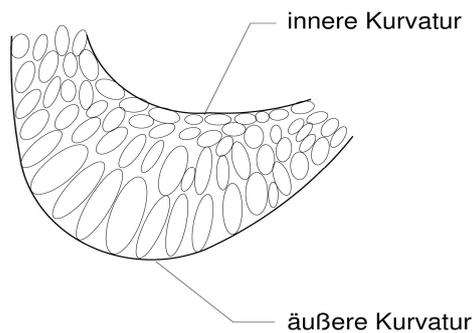
#### 3.2.5.2 Expansion der Herzkammern und Remodellierung der inneren Krümmung

Die im Laufe des Loopings konstant an Intensität zunehmenden hämodynamischen Kräfte spielen eine tragende Rolle sowohl bei dem mit Vorwölbung (engl.: „Ballooning“) einhergehenden starken Wachstum der Vorhöfe und Hauptkammern an der äußeren Krümmung als auch bei den Umstrukturierungsvorgängen an der inneren Krümmung (Christoffels et al., 2000a; Moorman und Christoffels, 2003; Hahurij et al., 2014; Johnson et al., 2015).

Blutdruck-bedingte Dehnung und Blutfluss-bedingte Reibung manifestieren sich in einer spezifischen, regional differentiellen Architektur des Aktinzytoskeletts in den Kardiomyozyten, das seinerseits die äußere Form des Herzens maßgeblich beeinflusst. Dabei stehen die extrinsischen, hämodynamischen Kräfte in einem empfindlichen Gleichgewicht mit den intrinsischen, kontraktilen Kräften.

Das Myokard der äußeren konvexen Krümmung ist einer Dehnung durch den zyklischen Blutdruckanstieg ausgesetzt. Diese Krafteinwirkung führt zur Elongation der Kardiomyozyten

und ihrer Anordnung in Richtung der wirkenden Kraft, also perpendikular zur arteriovenösen Achse (Auman et al., 2007; Mickoleit et al., 2014) (siehe Abb.25).



**Abb.25:** Veränderung der Kardiomyozytenmorphologie während des Loopings: rundliche Zellform an der inneren Kurvatur wie ursprünglich im geraden Herzschlauch, Elongation der Zellen in Verbindung mit perpendikulärer Anordnung an der äußeren Kurvatur; eigene Darstellung

Die Zellformveränderungen spiegeln sich auch in einer veränderten zytoskelettalen Architektur wider. Die ursprünglich zirkumferentiellen Aktinfasern an der äußeren Kurvatur werden mehr zufällig arrangiert, wohingegen sie an der inneren Kurvatur zirkumferentiell orientiert bleiben (Itasaki et al., 1989; Shiraishi et al., 1992).

Die im Verlauf des S-Loopings einsetzende verstärkte proliferative Aktivität des Myokards an der äußeren Kurvatur sowie die Zunahme der Anzahl und Reifung der Myofibrillen in den Kardiomyozyten im Sinne eines hypertrophen Wachstums wirken der Dehnung entgegen. Gleichsam erhöhen sich Kontraktionskraft und Blutflussgeschwindigkeit, die wiederum in einer Verstärkung der hämodynamischen Kräfte resultieren (Meilhac et al., 2004b; Soufan et al., 2006; Hirschy et al., 2006; Auman et al., 2007; Lin et al., 2012c; Bressan et al., 2014).

Ineffizienter Blutfluss in die Ventrikel auf Grund von mangelnder Kontraktibilität des Atriums führt beim Zebrafisch zur Entstehung zu kleiner Hauptkammern mit kleinen rundlichen Kardiomyozyten auch an der äußeren Kurvatur. Bei fehlender Kontraktibilität des Ventrikels scheint dieser vergrößert und dünnwandig („ausgeleiert“) (Berdougo et al., 2003; Auman et al., 2007). Die diesem Phänomen zugrunde liegenden transkriptionalen Netzwerke werden in Abschnitt 3.3.2.1 eingehender beleuchtet.

**Scherspannung:**  
Blutfluss-bedingte Reibungskraft an der inneren Gefäßwand parallel zum Gefäßverlauf

Scherspannung\* entsteht durch Blutfluss-bedingte Reibungskräfte an der Wand des Endokards und ist sowohl von der Fließgeschwindigkeit als auch von der Blutviskosität abhängig (Linask und Van Auker, 2007).

In den sich ausweitenden atrialen und ventrikulären Kammern entstehen Wirbel, die zu Scherspannungsgradienten führen mit großer Scherspannung an der inneren Kurvatur auf Grund hoher Blutflussgeschwindigkeit und geringer Scherspannung an der äußeren Kurvatur, wo die Geschwindigkeit des Blutstroms geringer ist (DeGroff et al., 2003; Jenkins et al., 2006). Als Mechanosensoren dieser Wandscherspannung fungierende Endokardzellen registrieren veränderten Blutfluss über verschiedene Membran-Rezeptoren, wie *Integrine*, *N-Cadherin*, *PECAM1 (CD31)*, *VE-Cadherin*, *VEGFR2 (Flk-1)* (Tzima et al., 2005; Lehoux et al., 2006; Collins et al., 2012), über nicht motile Primärzilien (Van der Heiden et al., 2006; Egorova et al., 2011a und b; Gerhardt et al., 2013), sowie mechanosensitive Ionenkanäle, wie *Pkd2 (Polycystic kidney disease 2)*, *Trpv4 (transient receptor potential cation channel, subfamily V/4)* und sogenannte *Piezo-Proteine* (Ranade et al., 2014; Heckel et al., 2015).

Die Stimulation verschiedener mechanosensitiver Signalwege führt zur Heraufregulation Blutfluss-responsiver Gene im Endokard. Das Gen des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Krüppel-like-factor2 (KLF2)*, ist das bislang am besten charakterisierte Ziel (Huddleson et al., 2004 und 2005; Egorova et al., 2011b; Chiplunkar et al., 2013; Novodvorsky und Chico, 2014). *KLF2* spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus (Dekker et al., 2002; Dekker et al., 2005), teilweise über die Aktivierung des Enzyms *endotheliale Stickoxidsynthase3 (eNOS3)* und Hemmung des Transkriptionsfaktors *Endothelin-1 (ET1)* (Groenendijk et al., 2007). *KLF2* wird spezifisch von Endokardzellen exprimiert, besonders

stark im Atrioventrikularkanal, an der inneren Krümmung und im Ausflusstrakt, also in Regionen mit ausgesprochen hoher Scherspannung (Groenendijk et al., 2004). Die Expression des *KLF2*-Gens wird bei der Maus maßgeblich vom *CCM* (*cerebral cavernous malformations*) *multiprotein complex* kontrolliert (Zhou et al., 2015). Beim Zebrafisch nimmt *KLF2* über die Aktivierung verschiedener *MikroRNAs* Einfluss auf die endokardiale Zellmorphologie mit Restriktion der Zellgröße an der inneren Krümmung und Elongation an der äußeren Krümmung (Deacon et al., 2010; Hergenreider et al., 2012; Banjo et al., 2013; Dietrich et al., 2014). Die Kardiomyozyten scheinen sich (passiv) an die regional unterschiedlichen endokardialen Zellformen zu adaptieren (Auman et al., 2007; reviewed in Haack und Abdelilah-Seyfried, 2016).

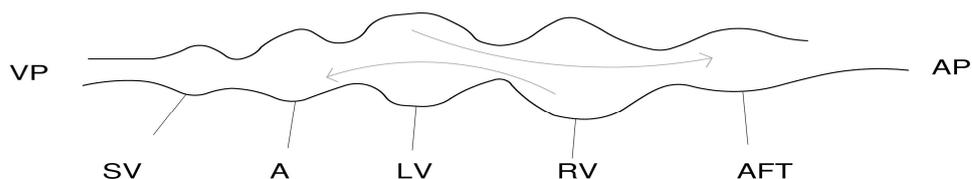
Die innere Krümmung wird durch geringere Zellgröße gekoppelt mit verhältnismäßig geringer Proliferationsrate „zusammengedrängt“ und damit fester als die äußere Krümmung (Zamir et al., 2003). Diese Umbauvorgänge bringen die unterschiedlichen Herzsegmente schließlich derart miteinander in Verbindung, dass ein parallel geschalteter Blutfluss erst möglich wird (Moorman und Christoffels, 2003).

### 3.2.5.3 Segment- versus Ballontheorie

In frühen Untersuchungen fand man bereits Regionen des Herzschlauchs, die nicht am Wachstum der Kammern teilnehmen. Diese Einschnürungen zwischen den expandierenden Vorhöfen und Hauptkammern wurden als „Ringe“ bezeichnet. Man verband sie funktionell mit dem Erregungsleitungssystem (Benninghoff, 1923).

Dies führte zur fehlerhaften Darstellung des Herzschlauchs als lineare Aneinanderreihung von sich gleichförmig vorwölbenden Herzkammern mit trennenden Ringen von Reizleitungsge- webe an den Übergängen (s. Abb. 26).

Dieses stark vereinfachende, zweidimensionale Konzept erschwert jedoch das Verständnis für die morphogenetischen Prozesse, die dazu führen, dass auch der rechte Ventrikel, der ja kranial des linken liegt, via Atrioventrikularkanal direkt Anschluss an den Einflusstrakt erhält bzw. der linke Ventrikel ohne Überbrückung von rechtsventrikulärem Gewebe Anschluss an den Ausflusstrakt erhält.

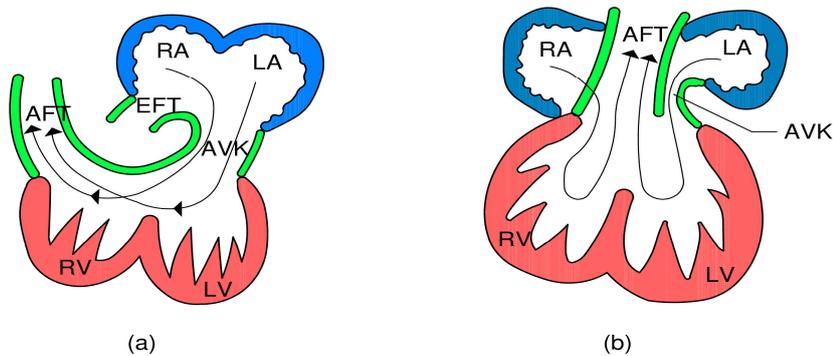


**Abb. 26:** Segmentmodell: alle Kompartimente des reifen Herzes sind im geraden Herzschlauch nacheinander geschaltet, die Pfeile symbolisieren den Blutfluss und verdeutlichen die Unmöglichkeit, ausgehend von diesem Modell die Blutflussverhältnisse im reifen Herzen ohne Überbrückung ventrikulärer Komponenten zu erklären; AP/VP: arterieller/venöser Pol, SV: Sinus venosus, A: Atrium, LV/RV: linker/rechter Ventrikel, AFT: Ausflusstrakt; modifiziert nach Moorman und Christoffels, 2003, Abb. 1B

Richtig ist natürlich, dass rechter und linker Ventrikel in einer kranio-kaudalen Sequenz im geraden Herzschlauch angeordnet sind, anders als die von Anfang an parallel geschalteten Atrien. Entscheidend ist jedoch, dass die Vorhöfe ausschließlich an der dorsalen und die Hauptkammern ausschließlich an der Ventralseite des Herzschlauchs expandieren. An der jeweils gegenüberliegenden Seite flankiert primäres, langsam proliferierendes Myokard die Herzkammern (Christoffels et al., 2000a; Moorman und Christoffels, 2003).

Dieses gewährleistet von Beginn an eine direkte (!) Verbindung zwischen Zellen des zukünftigen Ausflusstrakts und Zellen des Atrioventrikularkanal. Während des Loopings

persistiert dieses primäre „Brückenmyokard“ an der inneren Kurvatur. Erst in dieser Phase kommt es auch zur Herausbildung augenscheinlicher Segmente durch ballonartige Aufweitungen des rasch proliferierenden Myokards der äußeren Kurvatur. Dementgegen „schwindet“ das extrem langsam proliferierende Myokard der inneren Kurvatur. Das differentielle Wachstum von innerer vs. äußerer Kurvatur sowie die Remodellierungsvorgänge an der inneren Kurvatur führen schließlich dazu, dass Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt direkt mit beiden Ventrikeln verbunden sind („Ballontheorie“; Moorman und Christoffels, 2003) (siehe Abb.27).



**Abb.27:** Ballonmodell: Herzschlauch während des Loopings, nur an der äußeren Kurvatur (rot und blau dargestellt) bilden sich augenscheinliche „Segmente“, an der inneren Kurvatur (grün) verbindet primäres Myokard alle „Segmente“. Durch die in Relation zum Myokard der inneren Kurvatur massive Expansion des Myokards der äußeren Kurvatur sowie damit einhergehende Verlagerungsprozesse von Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt kommt es zur Trennung und Parallelschaltung rechter und linker Blutflüsse (Pfeile); EFT/AFT: Einfluss-/Ausflusstrakt, AVK: Atrioventrikularkanal, RA/LA: rechtes/linkes Atrium, RV/LV: rechter/linker Ventrikel; modifiziert nach Christoffels et al., 2000

### 3.2.6 Entstehung und Rolle des Epikards

Das Epikard (Syn.: Lamina visceralis des Herzbeutels) umhüllt als äußerste Schicht des Herzens das gesamte Myokard sowie die intraperikardialen Bereiche von Aorta und Arteria pulmonalis. Seine glatte Oberfläche ermöglicht es dem Herzbeutel, über das Herz zu gleiten. Während der Kardiogenese erfüllt es jedoch noch weit umfangreichere Aufgaben.

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie fand man den Ursprung epikardialer Zellen in villösen Protrusionen der kaudalen Zölomwand ventral am venösen Herzpol, nahe dem sich entwickelnden Septum transversum (Manasek, 1969; Viragh und Challice, 1981; Männer, 1993).

Diese vermutlich durch Signale aus der Septum transversum-Region/Leberknospe induzierte, blumenkohlartige Struktur, auch Proepikardiales Organ, besser jedoch Proepikardiale Serosa genannt, entspringt beim Huhn ab HH14 (Maus am E9) aus einer Region der kaudalen Zölomserosa, die auf die kaudolateralen Ränder des präkardialen Mesoderms zurückgeht und auch die myokardiale Quelle des zukünftigen Sinus venosus bildet (Männer et al., 1992; Ishii et al., 2007; Van Wijk et al., 2009; Mommersteeg et al., 2010). Entwicklungsgeschichtlich handelt es sich vermutlich um ein „Überbleibsel“ eines archaischen externen pronephrischen Glomerulus (Pombal et al., 2008; Cano et al., 2015).

Eine analoge Struktur, die man im Gegensatz zur „venösen“ als „arterielle“ Proepikardiale Serosa bezeichnet, entsteht etwas später auch am arteriellen Herzpol. Ihre Bedeutung erschöpft sich aber weitgehend in der epikardialen Umhüllung der großen herznahen Arterien

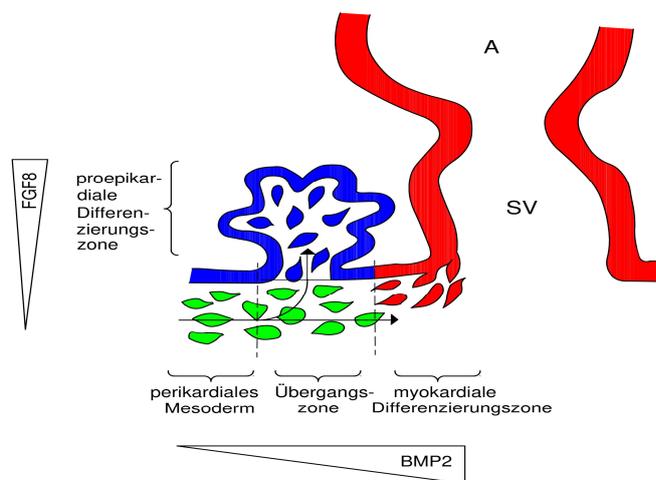
(Gittenberger de Groot et al., 2000, 2012; Perez-Pomares et al., 2003; reviewed in Lie-Venema et al., 2007).

Beide proepikardialen Vorläuferpopulationen sind verbunden mit der äußeren Schicht des perikardialen Zöloms, dem Perikard, das die laterale Körperwand überzieht. Die Loslösung der pleuroperikardialen Membranen von der lateralen Körperwand erfolgt bei der Maus von E12.5 bis E14.5 durch Transkriptionsfaktor *Wilms Tumor (WT)1*- und *Retinsäure*-vermittelte epithelio-mesenchymale Transition und Apoptose im subzölomalen Mesenchym (Norden et al., 2010).

Im Fokus der nachfolgenden Ausführungen steht auf Grund seiner herausragenden Bedeutung stets die Proepikardiale Serosa des venösen Herzpols.

Ein komplexes Wechselspiel zwischen *BMP*- und *FGF*-Signalen koordiniert unter Etablierung von Gradienten die Bildung myokardialer Vorläuferzellen für den Einflusstrakt sowie die Proliferation der Proepikardialen Serosa (Van Wijk et al., 2009). Hohe *BMP2*-Aktivität im Myokard des Einflusstrakts bei der Maus induziert die kardiomyogene Differenzierung, hohe *FGF8*-Präsenz in der Proepikardialen Serosa hingegen hemmt die Differenzierung in Kardiomyozyten und fördert die Entstehung proepikardialer Zellen. Ein minimales, durch *Notch2*\* reguliertes *BMP2*-Level ist notwendig für die Spezifikation der proepikardialen Zellen und ihr spezifisches, durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Tbox (Tbx)18* und *WT1* gekennzeichnetes, transkriptionales Profil. Beim Huhn dominieren *BMP5,7* und *10* im Einflusstraktmyokard sowie *FGF2* und *10*, aber auch *BMP4* in der proepikardialen Serosa (Moore et al., 1999; Kruithof et al., 2006; Schlueter et al., 2006; Schulte, 2007; Christoffels et al., 2006; Torlopp et al., 2010; Del Monte et al., 2011; Wang et al., 2015) (siehe Abb.28).

**Notch-Signalweg:**  
lokaler Zellsignalweg, Interaktion via membrangebundene Rezeptoren *Notch 1-4* und Liganden *Delta 1,3,4* und *Jagged 1,2*; involviert in Spezifikation von Zellschicksalen, Differenzierung und Musterbildung

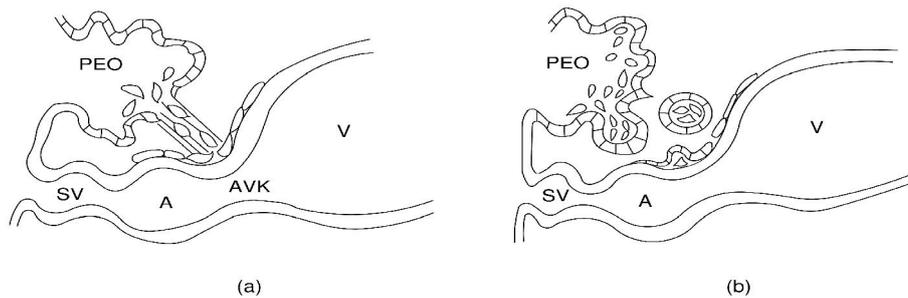


**Abb.28:** Entstehung der Proepikardialen Serosa am venösen Herzpol: Gradienten von *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein2) und *FGF8* (Fibroblast Growth Factor8) dirigieren die Generierung proepikardialer und myokardialer Vorläuferzellen aus dem kaudalen Zölomepithel (perikardiales Mesoderm), A - Atrium, SV - Sinus venosus; modifiziert nach Kruithof et al., 2006, Abb.1/6 und Del Monte et al., 2011, Abb.8A

Beim Säuger entwickelt sich das Proepikardiale Organ bilateral symmetrisch mit Verschmelzung beider Anlagen (Schulte et al., 2007). Beim Huhn verläuft die Entwicklung bilateral asymmetrisch mit Apoptose der linksseitigen Anlage (Torlopp et al., 2010). Die rechtsseitig betonte *FGF8*-Produktion kontrolliert dies maßgeblich (Schlueter und Brand, 2009). Die proepikardialen Zellen exprimieren, wie alle präkardialen Zellpopulationen, jedoch nur früh- und kurzzeitig (Maus bis E7.5) die Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *Isl-1* (Mommersteeg et al., 2010).

Die schnell proliferierende, multipotente Zellpopulation umwächst den Herzschlauch ausgehend von der Dorsalseite des Atrioventrikularkanal in einem räumlich-zeitlich

festgelegten Muster ab HH17 bis etwa HH26 (Huhn) bzw. ab E9.5 bis E10.5 (Maus). Beim Mäusemryo werden die proepikardialen Zellen überwiegend in Form von sogenannten „Zysten“ (epithelialer Monolayer mit mesenchyalem Kern, nicht-pathologisch wie im ursprünglichen Sinne) in die Perikardhöhle entlassen. Beim Hühner- und auch beim Rattenemryo hingegen wandern proepikardiale Zellen mehrheitlich über eine auf extrazellulärer Matrix basierenden „Brücke“ zum Herzen. Der jeweils andere Migrationsmodus findet sich aber auch zu einem geringen Teil in den erwähnten Spezies (Viragh und Challice, 1981; Männer, 1992; Vrancken-Peeters et al., 1995; Nahirney et al., 2003; Wessels und Perez-Pomares, 2004; Hirose et al., 2006; Rodgers et al., 2008; Nesbitt et al., 2006) (siehe Abb.29).



**Abb.29:** Migrationsmodi proepikardialer Zellen: beim Huhn (a) überbrückt extrazelluläre Matrix den perikardialen Raum zwischen Proepikardialem Organ und Atrioventrikularkanal, auf dieser Grundlage wandern die proepikardialen Zellen zum Herzen; bei der Maus (b) bildet das Proepikardiale Organ „Zysten“, die chemotaktisch geleitet zum Myokard des Atrioventrikularkanals wandern, PEO-Proepikardiales Organ, SV-Sinus venosus, A-Atrium, V-Ventrikel, ECM-extrazelluläre Matrix; eigene Darstellung

Für die Ausbreitung der epikardialen Zellen sind vom Proepikardialen Organ und epikardialen Zellen ausgehende *Retinsäure*-Signale sowie durch diese regulierte *Tbx5*-Aktivität unerlässlich (Jenkins et al., 2005; Bimber et al., 2007; Diman et al., 2014). Die ausgeprägte *BMP2*- und *BMP4*-Expression des Atrioventrikularkanals scheint eine chemotaktische Wirkung auf die migrierenden Zellen zu besitzen (Ishii et al., 2010).

Die Anheftung an das Myokard wird durch die ausbalancierte Interaktion zwischen dem myokardial exprimierten Zelladhäsionsmolekül *VCAM-1* (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) und von den Epikardzellen exprimiertem, von *WT1* induziertem *Integrin alpha4* ermöglicht (Kwee et al., 1995; Sengbusch et al., 2002; Kirschner et al., 2006; Pae et al., 2008). Daraufhin flachen die proepikardialen Zellen ab und etablieren ein einschichtiges Epithel (Hirose et al., 2006). *WT1*-Ziele sind auch das Gen für *Erythropoietin* und *E-Cadherin* (Zelladhäsionsmolekül) (Hosono et al., 2000; Dame et al., 2006).

Studien am Zebrafisch lassen vermuten, dass auch mit der Myokardkontraktion einhergehende perikardiale Flüssigkeitsbewegungen im Sinne einer Advektion für die Translokation der proepikardialen Zellen bedeutsam sind (Peralta et al., 2013).

Der (Pro-) Epikard-spezifische Transkriptionsfaktor *Tbx18* ist nicht notwendig für die Bildung des Epikards, jedoch für die Entstehung des Sinus venosus (Christoffels et al., 2006).

Weitere für die Proliferation und Differenzierung proepikardialer Zellen bedeutsame Transkriptionsfaktoren sind *GATA4,5,6* sowie *SRF* (*Serum Response Factor*) und *Epicardin* (Landerholm et al., 1999; Nemer und Nemer, 2003; Watt et al., 2004; Robb et al., 1998; Nelson et al., 2006).

Bereits während, aber vor allem nach Bildung der Epikardschicht, durchläuft ein Teil dieser Zellen eine epithelio-mesenchymale Transition. Diese Zellen werden „epicardium-derived cells“, also dem Epikard entstammende Zellen, genannt (Gittenberger de Groot et al., 1998).

Die sogenannten „epicardium-derived cells“ wandern, ausgehend vom subepikardialen Raum, über das Myokard bis in den subendokardialen Bereich und erfüllen sowohl durch physischen Beitrag als auch in ihrer Funktion als Signalgeber eine Reihe wichtiger Aufgaben in den unterschiedlichen Gewebsschichten des Herzens (Gittenberger de Groot et al., 1998).

Sie und von ihnen ausgehende molekulare Signale sind maßgeblich an der Entstehung der Tunica muscularis und Adventitia der Koronargefäße, der interstitiellen Fibroblasten, der Herzklappen sowie des Anulus fibrosus beteiligt (Gittenberger de Groot et al., 1998; Kolditz et al., 2008; Lie-Venema et al., 2008; Zhou et al., 2010). Darüberhinaus ist bekannt, dass „epicardium-derived cells“ und auch das Epikard die Expansion des Ventrikelmyokards und die Reifung der Purkinjefasern fördern (Merki et al., 2005; Lavine et al., 2005; Eralp et al., 2006). Die konkreten Mechanismen dieser Vorgänge werden in den entsprechenden nachfolgenden Kapiteln abgehandelt.

Ob „epicardium-derived cells“ auch in vivo die Fähigkeit haben, in Kardiomyozyten zu transformieren und einen signifikanten zellulären Beitrag zum Myokard zu leisten, ist umstritten (Männer, 1999; Cai et al., 2008; Zhou et al., 2008; Christoffels et al., 2009).

Dennoch erregen die Multipotenz embryonaler sowie die parakrinen Fähigkeiten aktivierter reifer Epikardzellen unvermindert das Interesse der Forscher, da sie die Hoffnung wecken, eine effektive Therapieoption für Myokardschäden durch Herzinfarkt zu kreieren (Zhou et al., 2011).

### 3.3 Die Septierung des Herzens

#### 3.3.1 Bekanntes Wissen und obsoleete Ansätze

Nachdem Looping und die Expansion der Vorhöfe und Hauptkammern die sich fortwährend herausbildenden unterschiedlichen Segmente des Herzschlauchs in ihre endgültige Position zueinander gebracht haben, sind alle Komponenten des noch unreifen Herzens, sprich Sinus venosus, rechtes und linkes Atrium, Atrioventrikularkanal, linker und rechter Ventrikel sowie Ausflusstrakt, deutlich differenzierbar (Männer, 2000).

Die bereits während des Loopings einsetzende und chronologisch sowie morphologisch eng miteinander verknüpfte Entstehung von Herzklappen und Kammersepten vollendet die physikalische Trennung des Blutkreislaufs in pulmonale und systemische Zirkulation (Anderson et al., 2003b).

Während die Septierung der Vorhöfe in den gegenwärtigen Lehrbüchern i. A. morphogenetisch vergleichsweise ausführlich beschrieben wird, sind die Informationen zur Bildung von Hauptkammerseptum und Herzklappen sehr spärlich.

Die zwischen Atrien und Ventrikeln befindlichen Atrioventrikularklappen entstehen nach der Fusion von kranialem (superiorem) und kaudalem (inferiorem) Endokardkissen und damit einhergehender Teilung des gemeinsamen Atrioventrikularkanal aus subendothelialen mesenchymalen Gewebsproliferationen an den Rändern von linkem und rechtem Orifizium (Patten und Kramer, 1948; Markwald et al., 1979; McGready et al., 2006). Nach Remodellierung und Degradation des subvalvulären Myokards bilden sich die über sehnenartige Stränge an den Papillarmuskeln verankerten reifen Klappenblätter heraus (McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010).

Die am Stamm von Aorta und Arteria pulmonalis ansässigen Semilunarklappen entstehen nach der Trennung des ursprünglich gemeinsamen Ausflusstrakts ebenfalls aus subendothelialen mesenchymalen Gewebsproliferationen (Markwald et al., 1977; Ya et al., 1998; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010).

Das endgültige Vorhofseptum besteht verallgemeinert aus zwei unvollständig überlappenden Septen. Das Septum primum wächst als halbmondförmige, muskuläre Trennwand vom Dach des gemeinsamen Atriums in Richtung Atrioventrikularkanal. Bevor sich das von ihm begrenzte Foramen primum schließt, kommt es durch Apoptose in seinem Zentralteil zur Entstehung des Foramen secundum. Rechts des Septum primum kommt es kurze Zeit später zur Einfaltung der Dorsalwand des zukünftigen rechten Atriums. Sie bildet mit ihrem freien Rand und dem Foramen secundum das Foramen ovale (Rüsse und Sinowatz, 1998; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010).

Das Septum interventriculare entsteht durch die Apposition und Fusion der sich gegenüberliegenden Wände von rechtem und linkem Ventrikel am durch das zentrifugale Wachstum der Hauptkammern tiefer werdenden Sulcus interventricularis (Goor et al., 1970; Harh und Paul, 1975; McGready et al., 2006).

Informationen über Septierung und Valvulogenese sind in gängigen Lehrbüchern äußerst dürftig, einzig die Teilung des Atriums wird recht ausführlich beschrieben.

Bei der Entstehung der Atrioventrikularklappen muss eine Differenzierung zwischen muralen (wandständigen) und septalen (am Septum verankerten) Klappenblättern vorgenommen werden, da es hinsichtlich Morphogenese und Herkunft der Mesenchymzellen signifikante Unterschiede gibt.

Eine nach wie vor weit verbreitete, aber mittlerweile widerlegte Meinung ist, dass das interatriale Septum und die dorsomediale Wand der Atrien aus atrialem Myokard entstünden (McGready et al., 2006).

Die ehemals als Septum secundum angesprochene Einfaltung der Dorsalwand des rechten Atriums wurde in alten Lehrwerken in seiner Ausdehnung massiv überschätzt.

Eine weitere, für die atriale Septierung tatsächlich bedeutende Struktur, die sog. dorsale mesenchymale Protrusion, findet, obgleich schon länger bekannt, in Lehrbüchern hingegen keinerlei Erwähnung (His, 1880; Mommersteeg et al., 2006).

Falsch ist auch die noch in einigen Büchern publizierte Anschauung, das Septum interventriculare wachse aktiv in Richtung des Atrioventrikularkanals (De La Cruz et al., 1997; Hyttel et al., 2010; Rüsse und Sinowatz, 1998 und 2015).

Die komplizierte Separierung des Ausflusstrakts, die per definitionem ebenfalls diesem Abschnitt zugeordnet werden müsste, wird im Abschnitt zur Entwicklung des arteriellen Herzpols abgehandelt.

### 3.3.2 Regionale transkriptionale Programme

Die Basis für die Entstehung der Herzkammern sowie der Septen und Herzklappen bilden regionalisierte Genexpressionsmuster. Nach derzeitiger Ansicht erfolgt die Spezifikation des primären Myokards in Kammer- und Nicht-Kammer-Myokard durch Musterbildungsereignisse in einer frühen Phase der Herzschaubildung. Die Integration anteroposteriorer und dorsoventraler Genexpressionsmuster (s. Abschnitt 2) führt zu lokal begrenztem An- bzw. Ausschalten spezifischer transkriptionaler Regulatoren, die ihrerseits genetische Programme anstoßen, welche die morphologische Ausprägung spezieller Kompartimente und Strukturen, sprich Herzkammern sowie Septen und Herzklappen, zur Folge haben (Christoffels et al., 2000).

#### 3.3.2.1 Kammer-spezifische Genexpression

Das transkriptionale Profil des Myokards der atrialen und ventrikulären Kammern an der äußeren Kurvatur des Herzens unterscheidet sich signifikant von dem des Myokards an der inneren Kurvatur. Es legt die Weichen für das starke Wachstum der Herzkammern und den zellulären Phänotyp im Gegensatz zum flankierenden primären Myokard (Christoffels et al., 2000b).

Zu Beginn der Vor- und Hauptkammerexpansion (Huhn ab HH12) entstehen an der luminalen Seite der Hauptkammern an der luminalen Seite der äußeren Kurvatur Trabekel. Diese in das Ventrikellumen ragenden, konischen Gebilde erstrecken sich durch lokale, gerichtete Proliferation von Kardiomyozyten der Ventrikelwand transmural vom Epikard zum Endokard. Als dichtes Geflecht durchziehen sie alsbald fast das gesamte Ventrikellumen, etwas ausgeprägter im linken im Vergleich zum rechten Ventrikel, und gewährleisten durch Minimierung des Diffusionsabstands die Versorgung des schnell wachsenden Myokards. In den Atrien ist die Trabekularisierung schwächer ausgeprägt (Mikawa et al., 1992; Sedmera et al., 1999, 2000; Soufan et al., 2006; Captur et al., 2016) (Siehe Abb.30 unten).

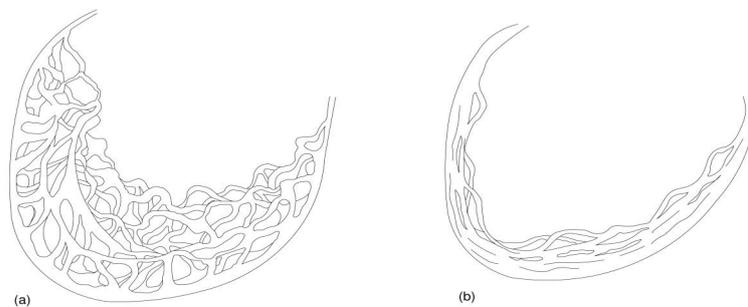
Stimuliert wird die Trabekularisierung durch Signale vom Endokard. Durch Zilien registrierte hämodynamische Kräfte führen zur Induktion der endokardialen *Notch1*-Signaltransduktion. *Notch1* kontrolliert die Balance zwischen myokardialer Proliferation und Differenzierung über Förderung der myokardialen *BMP10*- und *Insulin-like Growth Factor*-Sekretion (proproliferativ) und Aktivierung von *ephrinB2*, einem Transmembranligand. *EphrinB2* wiederum aktiviert den Transkriptionsfaktor *dHAND*, welcher seinerseits direkt die Sekretion des Wachstumsfaktors *Neuregulin1* induziert. *Neuregulin1* steuert maßgeblich die Reifung/Differenzierung der Trabekel via myokardiales *Erb2*-Rezeptor (Lee et al., 1995; Hertig et al.,

1999; Chen et al., 2004; Grego-Bessa et al., 2007; Van Dusen et al., 2014; Captur et al., 2016).

Weiterhin sind auch *Nkx2.5* und *GATA4* Zielgene von *Notch* (reviewed in Saravanakumar und Devaraj, 2013). *Nkx2.5* steuert mit einer Reihe an Modifikatoren nicht nur Proliferation und Differenzierung der Kardiomyozyten, sondern auch die für die Trabekularisierung essentielle korrekte Ausrichtung der Myofibrillen (Ashraf et al., 2014; Panzer et al., 2017; Zhou et al., 2017).

Die transienten Zilien auf der Oberfläche von Endokard- und Myokardzellen in den freien Wänden der expandierenden Ventrikel medieren auch über *Shh* (*Sonic hedgehog*)- und *PDGF* (*Platelet-derived Growth Factor*, Wachstumsfaktor)-Signale die myokardiale Proliferation. Die Proliferationsrate ist an der Trabekelbasis am größten, während der Differenzierungsgrad zur Trabekelspitze hin zunimmt (Clement et al., 2009; Gerhardt et al., 2013).

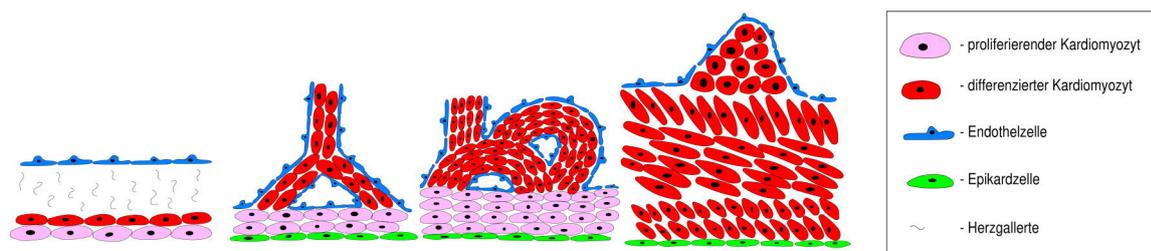
Mit Etablierung der epikardialen Umhüllung der Ventrikel beginnt das Trabekelmyokard unter Ausbildung adhärrierender interzellulärer Verbindungen sowie Kompression an der Ventrikelwand ausgehend von der epikardialen Seite durch Apposition der Trabekel zu kompaktieren. Im Vergleich zu rechtem Ventrikel sowie den Atrien tritt dieser Vorgang am deutlichsten im linken Ventrikel in Erscheinung (Sedmera et al., 1997) (siehe Abb.30).



**Abb.30:** Kompaktierung der Trabekel des ventrikulären Myokards; a) ausgeprägtes Trabekelnetzwerk b) Adhäsion und Kompression der Trabekel; eigene Darstellung

Nachdem die Proliferation des Trabekelmyokards stagniert, kommt es, induziert von epikardialen Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like Growth Factor 1/2*, *Erythropoietin*, *Retinsäure* sowie *FGF 2, 9, 16* und *20* zur massiven Zunahme der Proliferationsrate an der epikardialen Seite des Ventrikelmyokards (sog. Kompaktzone) (Pennisi et al., 2003; Stuckmann et al., 2003; Lavine et al., 2005; Li et al., 2011).

Das Kompaktmyokard (Arbeitsmyokard i. e. S.) verdrängt zunehmend das trabekuläre Myokard in Richtung des Lumens. Letzteres bildet die Grundlage für das ventrikuläre Erregungsleitungssystem sowie die Papillarmuskeln in den Ventrikeln bzw. für die *Musculi pectinati* der Atrien (Mikawa et al., 1992; Sedmera et al., 2000; Meilhac et al., 2003; Miquerol und Kelly, 2009) (siehe Abb.31).



**Abb.31:** Trabekularisierung, Kompaktierung und Kompaktzonenproliferation in den Ventrikeln; modifiziert nach Sedmera et al., 2000, Abb.9

Ein exklusiver Marker und unerlässlich für die Expansion von Haupt- und Vorkammern ist *Atrial natriuretic factor (Anf)*. Das *Anf*-Gen kodiert für ein in den Vorkammern des reifen Herzens ausgeschüttetes, der Blutdruckregulation dienendes Peptidhormon, welches bei Hypertrophie auch in den Ventrikeln heraufreguliert wird und im Embryo Konzentrationsabhängig der Regulation der Kardiomyozyten-Proliferation dient (Chien et al., 1991; Becker et al., 2014). *Anf* wird bei der Maus ab E8.5 im Myokard der zukünftigen Ventrikel- und Atrienregionen exprimiert (Zeller et al., 1987, Christoffels et al., 2000a, b).

Verschiedene „Schlüssel“-Transkriptionsfaktoren, darunter *Nkx2.5*, *GATA4/5*, *Tbx5*, *Tbx20* und *Mef2C*, beeinflussen durch Interaktion sowohl mit dem *Anf*-Promoter als auch miteinander positiv die Expression von *Anf* (Lin et al., 1997; Tanaka et al., 1999; Bruneau et al., 2001b; Hiroi et al., 2001; Garg et al., 2003; Lavalley et al., 2006; Singh et al., 2010).

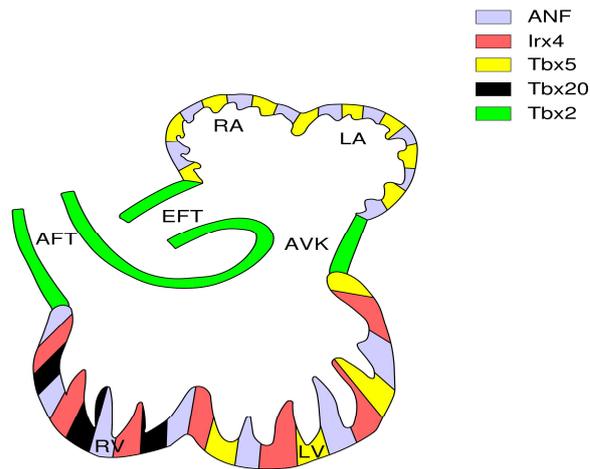
Die atriale bzw. ventrikuläre Identität der Kardiomyozyten wird bereits im lateralen Mesoderm durch die differentielle Rezeption von *BMP*-Signalen spezifiziert (Marques und Yelon, 2009).

*Irx4*, ein Mitglied der *Iroquois-related-homeobox*-Familie von Transkriptionsfaktoren, ist ebenfalls ein wichtiger Regulator der Hauptkammer-spezifischen Genexpression. Er aktiviert u.a. *Ventricular myosin heavy chain 1 (Vmhc1)*, die ventrikuläre Myosin-Isoform, und supprimiert *Amhc1*, die atriale Myosin-Isoform, im ventrikulären Myokard (Bao et al., 1999; Christoffels et al., 2000b; Nelson et al., 2014, 2016; Liu et al., 2016b). Dabei sind *Nkx2.5* und *dHAND* wichtige Modulatoren der stromabwärts gelegenen *Irx4*-Expression (Bruneau et al., 2000).

In den atrialen Kardiomyozyten induziert der Transkriptionsfaktor *COUPTFII (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor2)* das atriale und hemmt gleichzeitig das ventrikuläre Genprogramm (Lin et al., 2012b; Wu et al., 2013b).

Auch der in den Vor- und Hauptkammern mit von kaudal nach kranial abnehmendem Grad exprimierte Transkriptionsfaktor *Tbx5* fördert über Interaktion mit *Nkx2.5* und *GATA4* die Kammergenexpression und -proliferation (Hiroi et al., 2001; Garg et al., 2003). Als essentieller Faktor der anteroposterioren Musterbildung besitzt er daneben eine wichtige Rolle bei der Spezifikation von linkem vs. rechtem Ventrikel sowie ihrer morphologischen Trennung voneinander (Takeuchi et al., 2003). Eine Defizienz von *Tbx5* führt zu Hypoplasie von linkem Ventrikel und sinoatrialer Region (Bruneau et al., 2001b).

Nach anfänglicher Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx20* im gesamten Herzschlauch beschränkt sie sich nach dem Looping auf den rechten Ventrikel, den Atrioventrikularkanal und den Ausflusstrakt. Über Interaktion mit *Nkx2.5*, *GATA4/5* sowie *Tbx5* ist *Tbx20* ein positiver Regulator der Kammerentstehung (Stennard et al., 2003). Als direktes Zielgen von *BMP10*, das bei der Maus von E9.0 bis E13.5 im trabekulären Ventrikelmyokard exprimiert wird, ist *Tbx20* notwendig sowohl für das Wachstum und die Reifung des Ventrikelmyokards als auch für die Etablierung der Ventrikel-Identität (Zhang et al., 2011b). Desweiteren hemmt er in den Kammern *Tbx2*, einen spezifischen Nicht-Kammer-Myokard-Transkriptionsfaktor über Abschwächung der *BMP*-abhängigen Aktivierung von *Tbx2* (Stennard et al., 2005; Singh et al., 2009) (siehe Abb.32).



**Abb.32:** Transkriptionales Profil von Vorhof- und Hauptkammermyokard, RA: rechtes Atrium; LA: linkes Atrium, RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel, AFT: Ausflusstrakt, EFT: Einflusstrakt, AVK: Atrioventrikularkanal, ANF: Atrialer Natriuretischer Faktor, Irx4: Iroquois homeobox 4, Tbx5/20/2 : T-box 5/20/2 ; modifiziert nach Christoffels et al., 2000a, Abb. 6

### 3.3.2.2 Genexpressionsmuster im Nicht-Kammer-Myokard

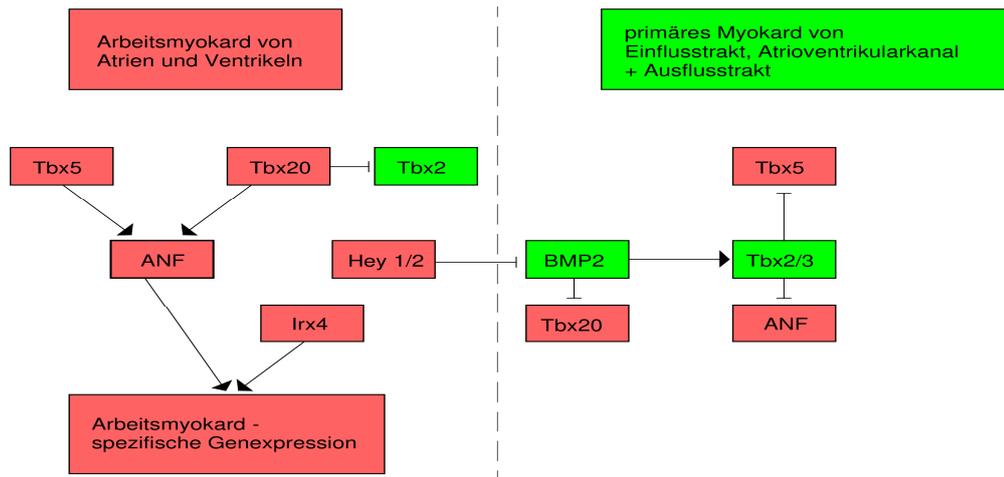
Völlig gegensätzlich zur Kammer-spezifischen Expression von *Anf* verhält es sich mit dem Expressionsmuster von *Tbx2*. Dieser Transkriptionsfaktor, der in Kooperation mit *Nkx2.5* als Repressor von kammer-spezifischen Genen wie *Anf* fungiert, wird ab E8.75 ausschließlich im primären Myokard von Einflusstrakt, Atrioventrikularkanal, innerer Kurvatur und Ausflusstrakt exprimiert (Habets et al., 2002; Christoffels et al., 2004; siehe Abb.32). Anfänglich überlappend mit *Tbx2* stellt sich das später auf die Komponenten der Erregungsleitungsstrukturen beschränkte Expressionsmuster von *Tbx3* dar (Yamada et al., 2000). *Tbx3* supprimiert wie auch *Tbx2* Kammer-spezifische Gene (Hoogaars et al., 2004). *Tbx2/3* scheinen Zielgene von *BMP2* und *4* zu sein.

Ab E8.5 im Atrioventrikularkanal der Maus exprimiertes *BMP2* induziert die *Tbx2*-Expression. *BMP4* hat vermutlich eine äquivalente Funktion im primitiven myokardialen Sinus venosus und im Ausflusstrakt (Yamada et al., 2000; Abdelwahid et al., 2001; Sugi et al., 2004b; Ma et al., 2005).

Die im Kammermyokard sowohl *Notch*-abhängig als auch *Notch*-unabhängig induzierten transkriptionalen Repressoren von *BMP2*, *Hairy-related*-Transkriptionsfaktoren (*Hey*) 1 und 2 beschränken die *BMP2*-Expressionsdomäne auf den Atrioventrikularkanal und die innere Kurvatur. In diesen Regionen wiederum hemmt *Tbx2* selbst über einen Feedback-Mechanismus die *Hey1/2*-Expression (Rutenberg et al., 2006).

Im Atrioventrikularkanal treten *Tbx2/3* in Konkurrenz zu *Tbx5*. Hoogaars et al. (2004) zeigten, dass *Tbx3* eine mindestens ebenso starke Affinität zum *Anf*-Promoter besitzt wie *Tbx5* und die synergistische Aktivierung von *Anf* durch den *Nkx2.5-Tbx5*-Komplex aufhebt. Ähnliches gilt auch für *Tbx2* (Habets et al., 2002).

Die *Tbx2*-inhibierende Wirkung von *Tbx20*, der ebenfalls im Atrioventrikularkanal präsent ist, wird möglicherweise durch das in dieser Region hohe *BMP*-Level aufgehoben (Singh et al., 2005) (siehe Abb.33).



**Abb.33:** Transkriptionale Regulation der Kammer-spezifischen (rot) Genexpression im Wechselspiel mit der des primären Myokards (grün), Tbx2/3/5/20: T-box-Transkriptionsfaktoren 2/3/5/20, ANF: Atrial Natriuretic Factor, Irx4: Iroquois-related homeobox4, Hey1/2: Hairy-related Transriptionsfaktoren 1/2, BMP2: Bone Morphogenetic Protein2; eigene Darstellung

Das Genexpressionsprofil des primären Myokards von Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt legt den Grundstein für die Entstehung der Atrioventrikular- resp. der Semilunarklappen.

### 3.3.3 Valvulogenese

#### 3.3.3.1 Entstehung der Atrioventrikularklappen

Die Bikuspidal/Mitral- und Trikuspidalklappen (Synonym: Atrioventrikularklappen bzw. Valva atrioventricularis sinistra et dextra) entstehen im linken bzw. rechten Atrioventrikularkanal und trennen das linke Atrium vom linken Ventrikel bzw. das rechte Atrium vom rechten Ventrikel. Ihre segelförmigen zwei (Bikuspidalklappe) bzw. drei (Trikuspidalklappe) Zipfel, die mittels Chordae tendineae, sehnenartiger Fäden, an den Papillarmuskeln der Ventrikel verankert sind, trugen ihnen auch die Bezeichnung als Segelklappen ein. Sie verhindern den Rückstrom von Blut in die Atrien während der Systole.

Bereits im tubulären Herzen gibt es zwei separate Blutströme. Die beständig zunehmenden hämodynamischen Kräfte, insbesondere die in den entscheidenden Regionen hohe Scherspannung, beeinflussen die Entstehung der Herzklappen maßgeblich durch Beeinflussung der Expressionslevel von spezifischen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren (Hahurij et al., 2014; Tibayan et al., 2015; Ford et al., 2017; Pestel et al., 2016).

Dabei steht die Kommunikation zwischen Endokard und Myokard und den im späteren Verlauf hinzukommenden interstitiellen Zellen der Herzklappen im Mittelpunkt der Umstrukturierungsvorgänge (Wu et al., 2017).

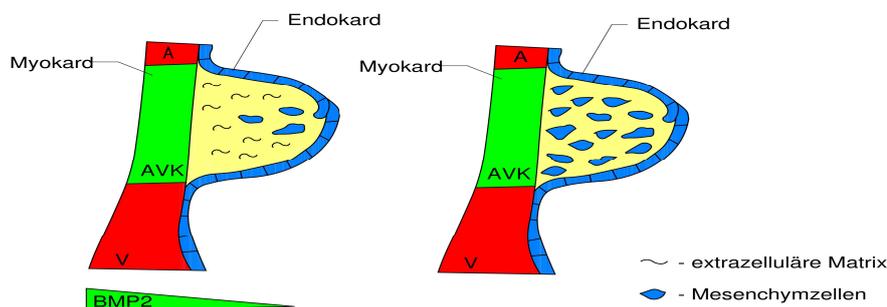
Während die zwischen Myo- und Endokard gelegene Herzgallerte in den Kammer-Regionen verschwindet, reguliert das Myokard des Atrioventrikularkanals nach Beginn des Loopings (HH15, E9.0) ihre Produktion in zwei gegenüberliegenden Segmenten herauf, was zur lokal begrenzten Invagination des Endokards ins Herzschlauchlumen führt (Markwald et al., 1975, 1977; Pestel et al., 2016).

Die Herzgallerte besteht aus überwiegend von Kardiomyozyten sezernierten Kollagenen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen (v.a. Hyaluronsäure), Signalmolekülen und extrazellulären Proteasen und spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung zwischen

Endokard und Myokard (Markwald et al., 1975; Borg et al., 1996; Klewer et al., 2006). Die Etablierung von Gradienten von Signalmolekülen wie *Shh*, *kanonisches Wnt* und *BMP2* mittels Heparansulfat ist unabdingbar für die konzentrationsabhängige Spezifikation von Zellschicksalen (Yan und Lin, 2009).

Die eng kontrollierte, ausbalancierte Produktion von Hyaluronsäure ist essentiell für die korrekte Ausbildung der sogenannten Endokardkissen und die nachfolgende epithelio-mesenchymale Transition des Endokards (Klewer et al., 2006; Lagendijk et al., 2013).

Ab HH17 (Huhn) bzw. E9.5 (Maus) delaminieren Zellen des Endokards im Bereich der Herzkissen nach dem Durchlaufen einer epithelio-(bzw. endokardio)-mesenchymalen Transition und bevölkern als proliferierende Mesenchymzellen die Endokardkissen, wobei sie durch polarisierte Stränge extrazellulärer Matrix in Richtung Myokard geleitet werden (Markwald et al., 1977 und 1979) (siehe Abb.34).



**Abb.34:** Bildung der Endokardkissen im Atrioventrikularkanal und epithelio-mesenchymale Transition der Endokardzellen unter Einfluss des *BMP2*-Gradienten im Atrioventrikularkanal, A - Atrienmyokard, V - Ventrikelmyokard, AVK - Atrioventrikularkanal; modifiziert nach Lin et al., 2012, Abb.5

Zu Beginn der Herzklappenentstehung kommt es zu Oszillationen des Blutstroms zwischen primitivem Atrium und primitivem linkem Ventrikel, die eine erhöhte Scherspannung in dieser Region verursachen. Der dadurch bedingte Verlust der Primärzilien im Atrioventrikularkanal ist notwendig für die Transformation des Endokards (Vermot et al., 2009; Egorova et al., 2011a; Yalcin et al., 2011). Stattdessen registriert die luminale endokardiale Glykokalyx (membrangebundene Makromoleküle, v.a. Glykosaminoglykane) die Scherspannungsanstiege in dieser Region. In die Weiterleitung bis hin zum Myokard sind zytoskelettale Elemente sowie Hyaluron- und Kieselsäure involviert (Tarbell und Ebong, 2008; Sewell-Loftin et al., 2014). Der Scherspannungs-responsive Transkriptionsfaktor *KLF2* fördert hier sowohl die Glykosaminoglykan-Produktion als auch die epithelio-mesenchymale Transition (Chiplunkar et al., 2013).

Der vom Myokard des Atrioventrikularkanal sezernierte Wachstumsfaktor *BMP2* fördert ebenfalls die regionale Expansion von extrazellulärer Matrix, v.a. Hyaluronsäure. *BMP2* induziert durch Aktivierung von *Semaphorin6D* (membrangebundenes Protein) auf den Endokardzellen, welches seinerseits mit der Regulation des Zytoskeletts assoziierte *Rho*-Proteine aktiviert, die epithelio-mesenchymale Transition des Endokards und die Migration der mesenchymalen Zellen (Ma et al., 2005; Peng et al., 2016). Weiterhin induziert *BMP2* die Expression der mesenchymtypischen Transkriptionsfaktoren *Twist1*, *Msx1* und *2* in den transformierten Zellen, die die *BMP2*-Produktion während der gesamten Valvulogenese fortsetzen, nachdem sie im atrioventrikulären Myokard herunterreguliert wurde (Sugi et al., 2004b; Ma et al., 2005; Rivera-Feliciano und Tabin, 2006; Rivera-Feliciano et al., 2006; Okagawa et al., 2007; Chen et al., 2008; Shelton et al., 2008).

Die Aktivierung des Transmembranrezeptors *Notch1* im atrioventrikulären Myokard durch den Liganden *Jagged1* begrenzt durch Suppression der *BMP2*-induzierten Proliferation des Herzklappenmesenchyms diese Prozesse (Luna-Zurita et al., 2010; Mac Grogan et al., 2016).

Die endokardiale Aktivität von *Notch1* im Atrioventrikularkanal via Ligand *Delta-like4* (*Dll4*) hingegen induziert über *TGFβ2* (beim Huhn auch *TGFβ3*)-Aktivierung vorrangig im Endokard die *Snail*-abhängige Suppression des Adhäsionsmoleküls *VE-Cadherin* und ermöglicht so die epithelio-mesenchymale Transition der Endokardzellen (Boyer et al., 1999; Bartram et al., 2001; Timmermann et al., 2004; Azhar et al., 2009; Luna-Zurita et al., 2010; Mac Grogan et al., 2016).

*TGFβ2* wird daneben durch myokardiales *BMP2* aktiviert und fördert auch durch Aktivierung von endokardialem *β-Catenin* die epithelio-mesenchymale Transition (Liebner et al., 2004). *Yes-activated protein1* (*YAP1*, Transkriptionsfaktor) moduliert die *TGFβ2*-Funktion (Zhang et al., 2014).

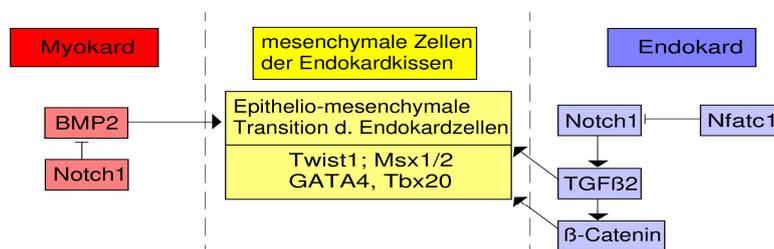
Der im Herzkissenendokard ebenfalls stark exprimierte Transkriptionsfaktor *Nfatc1* (*Nuclear factor of activated T-cells 1*) scheint als Gegenspieler von *Notch1* zu fungieren, da er diesen Vorgang durch die Suppression von *Snail1* und *2* hemmt. Dies ermöglicht den Erhalt einer proliferationsfähigen Population von Endokardzellen für die spätere Elongation der Klappenblätter (Zhou et al., 2005; Wu et al., 2011; Wu et al., 2013a).

Die Expression von *GATA4* und *Tbx20* in Zellen der Endokardkissen und daraus hervorgehender Mesenchymzellen fördert sowohl die epithelio-mesenchymale Transition als auch die Proliferation des Kissenmesenchyms (Rivera-Feliciano et al., 2006; Shelton und Yutzey, 2007; Moskowitz et al., 2011). *Tbx20* reguliert darüberhinaus die für die mesenchymale Proliferation notwendige *Wnt/β-Catenin*-Aktivität (Cai et al., 2013).

Wachstumsfaktoren der *Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*)-Familie besitzen eine räumlich-zeitlich differenzielle regulatorische Funktion während der epithelio-mesenchymalen Transition und der Herzkissenremodellierung. In der Frühphase wird *VEGF* durch *Nfatc1* gehemmt. Ab E11 entfällt die Suppression und *VEGF* fördert die Proliferation des Endokards, womit die Zellverluste durch die Delamination wieder ausgeglichen und die Elongation der Klappenblätter ermöglicht werden (Dor et al., 2001, 2003; Chang et al., 2004; Stankunas et al., 2010).

*FGF4* fördert ebenfalls die Proliferation der Kissenmesenchymzellen (Sugi et al., 2003).

*Epithelial Growth Factor* (*EGF*)-Wachstumsfaktoren sind stromabwärts des *Notch1-Jag1*-Signalwegs in die Begrenzung der mesenchymalen Proliferation eingebunden (Erickson et al., 1997; Iwamoto et al., 2003; Mac Grogan et al., 2016) (siehe Abb.35).



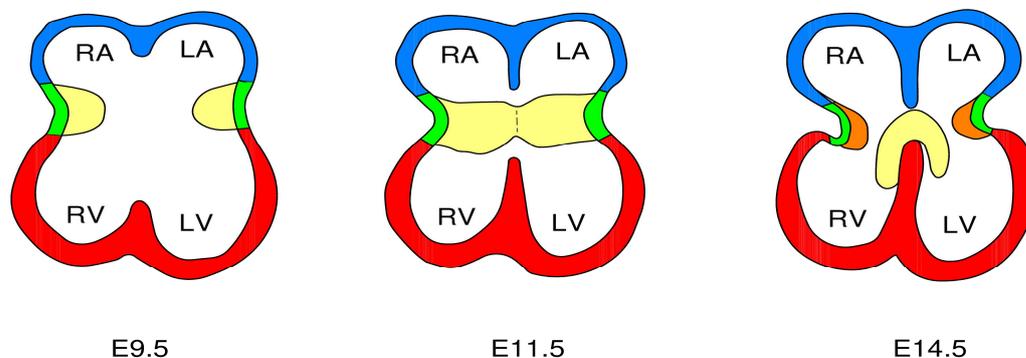
**Abb.35:** Regulation der epithelio-mesenchymalen Transition des Endokards, Pfeil=fördernder Einfluss, unterbrochener Pfeil=Hemmung, BMP2: Bone Morphogenetic Protein2, Msx1/2: Muscle segment homeobox1/2, GATA4: GATA-binding factor4, Tbx20: T-box20, Nfatc1: Nuclear factor of activated T-cells, TGFβ2: Transforming Growth Factorβ2; eigene Darstellung

Die nach ihrer Lage als kaudales (mit der äußeren Krümmung assoziiertes) und kraniales (mit der inneren Krümmung assoziiertes) Atrioventrikularkissen benannten mesenchymalen Massen fusionieren bei HH26 (Maus E11.5) miteinander und bilden so das Atrioventrikularseptum,

das den Atrioventrikularkanal teilt und später mit dem atrialen Septum primum, dem Ausflusstraktseptum und dem Ventrikelseptum verschmilzt (reviewed in Anderson et al., 2014 und 2016a). Im kaudalen Zweiten Herzfeld etablierte synergistische *Shh*- sowie *Tbx5*-vermittelte Aktivität steuert über *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren *Foxf1a* und *Foxf2* die atrioventrikuläre Septierung maßgeblich (Hoffmann et al., 2014).

Das septale Blatt der Trikuspidalklappe und das septale bzw. Aortenblatt der Mitralklappe entstehen als luminale Auswüchse dieses Atrioventrikularseptums (Lamers et al., 1995; reviewed in Snarr et al., 2008).

Der Atrioventrikularkanal, der bis dahin eine direkte Verbindung lediglich zum linken Ventrikel aufweist, beginnt während der Fusion der Atrioventrikularkissen nach rechts zu expandieren. Gleichzeitig wölbt er sich unter Ausbildung einer trichterartigen Form in Richtung Ventrikellumen ein. Diese im rechten Atrioventrikularkanal als trikuspidaler Trichter bezeichnete Struktur, ist im linken Atrioventrikularkanal schwächer ausgeprägt und bildet die muskuläre Grundlage für die Entstehung der muralen Klappenblätter (Lamers et al., 1995; Kim et al., 2001a). Dort entstehen zwischen E13.5 und 14.5 die lateralen/muralen Atrioventrikularkissen (Wessels et al., 1996) (siehe Abb.36).



**Abb.36:** Entstehung von kranialem und kaudalem Endokardkissen (gelb, E9.5), deren Fusion (E11.5) und Bildung der muralen Endokardkissen (orange, E14.5), RA/LA-rechtes/linkes Atrium, RV/LV-rechter/linker Ventrikel; eigene Darstellung

Im Gegensatz zu den größeren primären Endokardkissen enthalten sie weniger extrazelluläres Material und fusionieren nicht miteinander (Wessels et al., 1996; De Lange et al., 2004; reviewed in Snarr et al., 2008).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied liegt in der Herkunft der Mesenchymzellen: Die Entstehung beider Arten von Endokardkissen wird durch die epithelio-mesenchymale Transition des Endokards initiiert. Während aber der Mesenchymzell-Pool der primären Endokardkissen fast ausschließlich aus Endokardzellen gespeist wird, beruht die Entstehung der muralen Endokardkissen vorwiegend auf der Einwanderung einer großen Population von sogenannten „epicardium derived cells“ aus dem Sulcus atrioventricularis ab E12 (Gittenberger de Groot et al., 1998; Perez-Pomares et al., 2002b; Wessels et al., 2012).

„Epicardium-derived cells“ stellen neben wenigen Endokardzellen den Hauptanteil der Vorläufer späterer Herzklappen-Fibroblasten in den muralen Klappenblättern sowie auch der fibrösen Isolationsschicht zwischen Vor- und Hauptkammermyokard (Anulus fibrosus), wohingegen die Fibroblasten der septalen Klappenblätter zum überwiegenden Teil aus Endokardzellen hervorgehen (Kolditz et al., 2008; Zhou et al., 2010; Wessels et al., 2012).

Auch extrakardiale Zellpopulationen leisten einen Beitrag zum valvuloseptalen Komplex. Zirkulierende hämatopoietische Knochenmarkstammzellen und multipotente Neuralleistenzellen wandern ab E12.5 in das Interstitium der septalen Klappenblätter ein. Erstere differenzieren sich zum Teil in Fibroblasten. Neuralleistenzellen sind notwendig für die Reifung des Erregungsleitungssystems und nehmen i.d.R. einen neurogenen Phänotyp an. Jedoch

bleibt ein Anteil beider Zellpopulationen undifferenziert und könnte als Pool multipotenter Zellen für spätere Reifungs- oder Reparaturprozesse dienen (Nakamura et al., 2006a; Hajdu et al., 2011).

Die muralen Herzkissen und das darunterliegende Myokard des Atrioventrikularkanal, das sich alsbald zirkumferentiell ins ventrikuläre Lumen einstülpt, weisen zu Beginn der Valvulogenese eine enge Verbindung auf (Arrechedera et al., 1984; De Lange et al., 2004; De Vlaming et al., 2012).

An der ventrikulären Seite erhält dieses Myokardblatt Verbindungen zum trabekulären Myokard der expandierenden Ventrikel. Auf seiner atrialen Fläche entsteht bis E14.5 das nach distal wachsende Kissenmesenchym. Das atrioventrikuläre Myokard unterhalb der Kissen verschwindet ab E15.5 vermutlich überwiegend durch Apoptose, während das atrioventrikuläre Myokard oberhalb der Kissen als glattwandige myokardiale Komponente der Atrien persistiert. In etwa zeitgleich dringt mesenchymales Gewebe im Bereich des Sulcus atrioventricularis zwischen atriales und ventrikuläres Myokard, was zur elektrischen Isolation von Atrien und Ventrikeln führt (Oosthoek et al., 1998; Zhou et al., 2010).

Die mesenchymale, später fibröse, lediglich durch den Atrioventrikularknoten durchbrochene Kontinuität zwischen Atrioventrikularklappen, atrialem und ventrikulärem Myokard wird in ihrer Gesamtheit als Anulus fibrosus bezeichnet (Bakker et al., 2010b; Wessels et al., 2012).

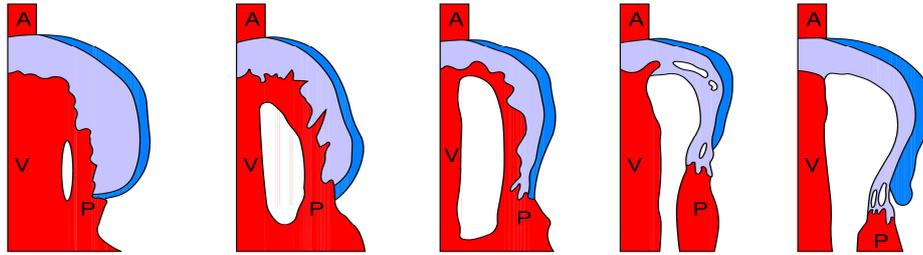
Das noch sehr dichte Trabekelmyokard bleibt auch nach dem Verschwinden des subvalvulären Myokards und Herausbildung des Klappenhalteapparats verbunden mit dem Kissenmesenchym (De Lange et al., 2004).

Die septalen Blätter beider Atrioventrikularklappen entstehen aus dem Mesenchym des atrioventrikulären Septums, das sich ab E14.5 über den Kamm des Ventrikelseptums legt. Rechts davon wächst das septale Blatt der Trikuspidalklappe am Myokard anliegend nach distal. Zwischen E16.5 und 17.5 beginnt es sich unter Ausbildung von Chordae vom Septummyokard zu lösen. Der links vom Septum interventriculare entstehende zentrale Anteil des Aortenblatts der Mitralklappe ist von Anfang an frei beweglich. Sein kranialer und kaudaler Teil sind aber ebenfalls am Myokard verankert und lösen sich auf dieselbe Weise wie die anderen Klappenblätter (Oosthoek et al., 1998; De Lange et al., 2004; Guzman et al., 2010).

Die vor der Delamination noch kissenartigen, mit dem darunterliegenden Myokard eng verbundenen primitiven Herzklappen bestehen aus zwei Schichten: (1) einer dichteren, zellreichen atrialen und (2) einer lockeren, zellarmen ventrikulären Schicht. Sie unterscheiden sich auch in Art und Verteilung von extrazellulärem Material. In der ventrikulären, also dem Ventrikellumen zugewandten Schicht bilden sich oberhalb des Ansatzes der sich durch Rückzug des Trabekelmyokards herausbildenden Papillarmuskeln Lücken. Dies geschieht in Folge von Reorganisation und Kondensation von Zellen sowie extrazellulären Materials. Hierbei kommt es auch zur Einwanderung myokardialer Zellen in das myokardnahe Kissenmesenchym. Die Lücken vergrößern sich zu sogenannten interchordalen Räumen. Das dazwischen liegende Kissengewebe verlängert sich und bildet schließlich unter fortgesetzter Verdichtung von Zellen und extrazellulärem Material die Chordae tendineae, welche die Herzklappen am Papillarmuskel verankern.

Sowohl die Klappenblätter als auch die Chordae, die sie am Papillarmuskel verankern, entstehen demnach überwiegend aus Herzkissengewebe (Oosthoek et al., 1998; Lincoln et al., 2004).

Diese für die muralen Klappenblätter beschriebenen Vorgänge scheinen, abgesehen vom Verschwinden subvalvulären Myokards, auch für die septalen Klappenblätter zuzutreffen, wenngleich der zentrale Teil des Aortenblatts der Mitralklappe von Anfang an frei beweglich ist (De Lange et al., 2004; Guzman et al., 2010) (siehe Abb.37).

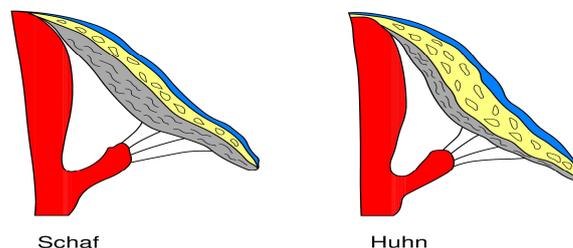


**Abb.37:** Remodellierung der Endokardkissen und Bildung des Klappenhalteapparats am Beispiel des septalen Blatts der Trikuspidalklappe, rot: Myokard, blau: atriale Schicht des Endokardkissens, hellblau: ventrikuläre Schicht des Endokardkissens, A- atriales Myokard, V- ventrikuläres Myokard, P- Papillarmuskel; modifiziert nach Oosthoek et al., 1998, Abb.1

Als Besonderheit der Vogelartigen sei an dieser Stelle die nur aus einem Blatt bestehende muskuläre rechte Atrioventrikularklappe, die zudem keinen Halteapparat besitzt, erwähnt. Ob sie aus persistierendem Myokard des Atrioventrikularkanals oder aus Myokard mesenchymalen Ursprungs hervorgeht, ist unbekannt. Die Mitralklappe hingegen besteht aus drei statt bei Säugern zwei Klappenblättern. Die Aperturen beider Herzklappen durchzieht beim Vogel ein durchgehendes myokardiales Band, das vermutlich durch Kontraktion den Klappenschluss unterstützt (Lu et al., 1993; Lincoln et al., 2004).

In der sich ab HH44 (E16.5) anschließenden, bis ins postnatale Stadium erstreckenden Reifungsphase verringert sich die proliferative Aktivität v.a. an der Klappenbasis und die Mesenchymzellen differenzieren sich zu Fibroblasten der Herzklappen (Lincoln et al., 2004).

Die Remodellierung, Sekretion sowie Proteolyse von extrazellulären Matrix-Komponenten mündet schließlich in der Etablierung von drei Schichten: (1) der Elastin-reichen Lamina atrialis, (2) der Proteoglykan-reichen Lamina spongiosa und (3) der Kollagen1-reichen Lamina fibrosa. Die Schichtdicke variiert zwischen den Spezies je nach hämodynamischen Anforderungen. So sind insbesondere die Lamina fibrosa, aber auch die Elastinschicht bei großen Säugern auf Kosten der Lamina spongiosa deutlich stärker ausgeprägt im Vergleich zu kleinen Säugetieren (Hinton et al., 2006; Lincoln et al., 2006; Peacock et al., 2008) (siehe Abb.38).



**Abb.38:** Aufbau der Klappenblätter in Abhängigkeit von den hämodynamischen Anforderungen am Beispiel von Schaf und Huhn, blau: Lamina atrialis, gelb: Lamina spongiosa, grau: Lamina fibrosa; eigene Darstellung

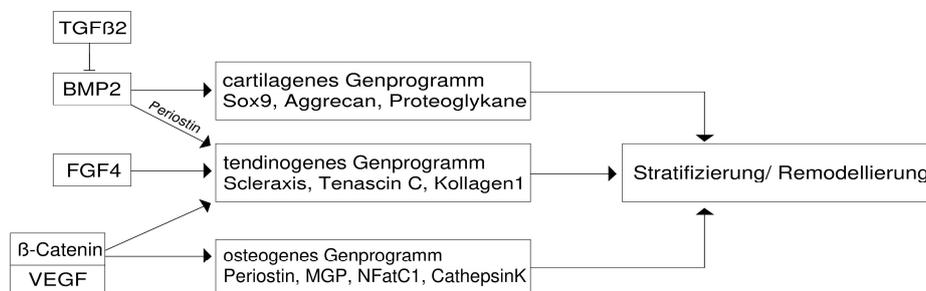
Während der Herzklappenreifung werden regulatorische Gene und Strukturproteine exprimiert, die auch bei sich entwickelndem Knochen-, Knorpel- und Sehngewebe auftreten (Lincoln et al., 2004; Lange und Yutzey, 2006; Chakraborty et al., 2008). Die Strukturproteine vermitteln in Schichten (s.o.) angeordnet die Eigenschaften unterschiedlicher

Bindegewebstypen, wie Steifheit, Stoßfestigkeit und Elastizität, um adäquate Form und Funktion der Klappen zu gewährleisten.

Die regulatorische Rolle von *BMP2* und *FGF4* bei der Diversifikation der Endokardkissen-Mesenchymzellen in Klappenblätter und Chordae tendineae weist starke Parallelen zur Diversifikation und Differenzierung von Knorpel- und Sehnenzellen auf. So induziert *BMP2* die Expression knorpeltypischer und *FGF4* die Expression sehnen typischer Gene (*Sox9* vs. *Scleraxis*) und extrazellulärer Matrixkomponenten (*Aggrecan* vs. *TenascinC*) in Mesenchymzellen (Lincoln et al., 2006). *VEGF* induziert den Osteoklasten-typischen Transkriptionsfaktor *NFATc1* und dieser wiederum das Enzym *CathepsinK* in prävalvulären Endokardzellen. *CathepsinK* unterstützt die für die Remodellierung der Herzkissen notwendige Degradation von extrazellulärer Matrix (De la Pompa et al., 1998; Combs und Yutzey, 2009). Kanonische *Wnt*-Signale fördern ebenfalls die osteogene Protein- und Genexpression (*Periostin* und *Matrix gla Protein (MGP)*, letzteres verhindert die Kalzifizierung in der Fibrosa) (Alfieri et al., 2010).

Auch *TGFβ2* nimmt eine essentielle Position bei der Zelldifferenzierung und der Regulation der Stratifizierung der Herzklappen ein. Desweiteren beschränkt *TGFβ2* die Bildung von Knorpelmatrix (Azhar et al., 2011).

*Periostin*, ein durch *BMP2* induziertes und von *Twist1* gefördertes extrazelluläres Matrixprotein verstärkt die Zellmigration, fördert die Differenzierung der mesenchymalen Herzkissenzellen in Fibroblasten und reguliert die Kollagen1-Fibrillogenese sowie die Kompaktierung und beeinflusst damit entscheidend die biomechanischen Eigenschaften der Klappen (Butcher et al., 2007a, b; Inai et al., 2008; Norris et al., 2008, 2009). Auch das *Periostin*, welches von den Herzklappen und den Anulus fibrosus bevölkernden „epicardium-derived cells“ produziert wird, leistet einen maßgeblichen Beitrag zur fibrösen Reifung dieser Gewebe (Kolditz et al., 2008; Lie-Venema et al., 2008; Zhou et al., 2010). Auch *Sox9* ist ein wichtiger Regulator der späten Organisation der extrazellulären Matrix der Herzklappen (Lincoln et al., 2007) (siehe Abb.39).



**Abb.39:** Regulation der Stratifizierung der Herzklappen, TGFβ: Transforming Growth Factor β, BMP2: Bone Morphogenetic Protein 2, FGF4: Fibroblast Growth Factor 4, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, nähere Erläuterungen im Text; eigene Darstellung

Der hoch organisierte und kompartimentierte Umbau der extrazellulären Matrix in den Klappen während der Reifung dient der Anpassung an erhöhten hämodynamischen Stress und resultiert sowohl in vermehrter Festigkeit als auch Elastizität (Butcher et al., 2007b; Tan et al., 2011).

Die hohe Scherspannung im Atrioventrikularkanal führt zum Teil zu einer durch *RhoA-GTPase*-Aktivität erhöhte zytoskeletale Spannung, welche wiederum die *Kollagen1*- und *TenascinC*-Produktion im Kissenmesenchym stimuliert (Tan et al., 2013).

Experimente an embryonalen Sehnen zeigen, dass Spannung ein essentieller Motor für die Zell-gestützte Ausrichtung der Kollagenfibrillen ist (Kapacce et al., 2008). Die kontraktile Fibroblasten, deren Aktinzytoskelett über Zelloberflächenmoleküle (Integrine) mit der umgebenden Matrix verbunden ist, „ziehen“ an diesen extrazellulären Proteinen. Dadurch

kommt es zur Ausrichtung und Kompaktierung von Zellen und Matrix (Kruithof et al., 2007; Butcher et al., 2007b).

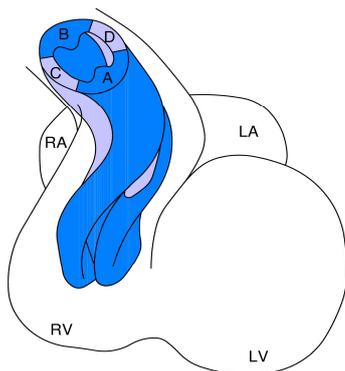
### 3.3.3.2 Entstehung der Semilunarklappen

Die am Ausflusstrakt ansässigen Aorten- und Pulmonalisklappen (Valva aortae und Valva trunci pulmonalis) bezeichnet man wegen der halbmondförmigen Aufhängung als Semilunar- und wegen der Form ihrer Blätter mit der Schwalbennest-artigen Vertiefung auch als Taschenklappen. Sie verhindern, dass während der Diastole Blut in die Ventrikel zurückströmt. Ihre Entstehung geht einher mit der Separierung des Ausflusstrakts in Aorta und Stamm der Arteria pulmonalis.

Der durch eine Krümmung in proximalen und distalen Anteil gegliederte Ausflusstrakt (alte Bezeichnung: Conotruncus) erstreckt sich am E9.5 vom distalen Ende des rechten Ventrikels bis zur Grenze der Perikardhöhle, wo er in den Aortensack übergeht, und besitzt anfänglich noch eine myokardiale Wand (Ya et al., 1998; Anderson et al., 2012).

Ab E10.5 bis E11.5 entsteht ein Paar endokardialer Kissen, die von endokardialen Mesenchymzellen bevölkert werden und sich über die gesamte Länge des Ausflusstrakts erstreckend spiralig umeinander winden. Nach ihren Ansatzstellen an der freien Wand des rechten Ventrikels bzw. im Bereich des entstehenden Ventrikelseptums werden sie auch als parietales resp. septales Ausflusstraktkissen bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Septierung des Ausflusstrakts und die Entstehung der Semilunarklappen. Weiterhin unterteilt man sie entsprechend der Anatomie des Ausflusstrakts jeweils in proximalen und distalen Teil.

Zu einem späteren Zeitpunkt entstehen zwischen den ursprünglichen Ausflusstraktkissen die sogenannten interkalierenden Kissen, deren Bedeutung sich ausschließlich auf die Genese der Semilunarklappen beschränkt (Tonge, 1869; Markwald et al., 1977; Ya et al., 1998). Allerdings wird die genaue Anzahl der Ausflusstraktkissen und deren Fusionsmuster innerhalb und zwischen den verschiedenen Tierarten kontrovers diskutiert (Qayyum et al., 2001; reviewed in Webb et al., 2003; Okamoto et al., 2010). Der Übersichtlichkeit und Verständlichkeit halber wurde in Übereinstimmung mit vielen Autoren die in der Abbildung gezeigte Darstellung gewählt (siehe Abb.40).



**Abb.40:** Konfiguration der Endokardkissen des Ausflusstrakts, A-parietales Endokardkissen, B- septales Endokardkissen, C- interkalierendes (aortales) Endokardkissen, D- interkalierendes (pulmonales) Endokardkissen, RA/LA- rechtes/linkes Atrium, RV/LV- rechter/linker Ventrikel, modifiziert nach Webb et al., 2003, Abb.10

Der Ausflusstrakt wird während der Septierung und der Semilunarklappenbildung fortgesetzt von myokardialen Progenitoren aus dem Sekundären Herzfeld, die über die Wände migrierend u.a. zum Wachstum des rechten Ventrikels beitragen, bevölkert. Von ihnen ausgehende molekulare Signale über *FGF8*, *BMP*, *Notch1* oder *Nfatc1* regulieren auch die Entwicklung der Herzklappen im Ausflusstrakt (Garg et al., 2005; McCulley et al., 2008; High et al., 2009; Lin et al., 2012a).

Ein bedeutsamer Aspekt der Semilunarklappenentwicklung ist auch der Beitrag sogenannter „cardiac neural crest cells“ (kardiale Neuralleistenzellen). Diese Zellpopulation delaminiert ab E8.5 vom dorsalen Neuralrohr und wandert über die Kiemenbögen am E10 in den distalen Ausflusstrakt ein (Kirby et al., 1983; Jiang et al., 2000; Gitler et al., 2002). Als wichtige Quelle extrakardialer Mesenchymzellen sowie postganglionärer neuraler Progenitoren ist sie maßgeblich an der Septierung des Ausflusstrakts beteiligt und unabdingbar für die korrekte Morphogenese nicht nur der Semilunarklappen, sondern der gesamten Ausflusstraktregion und der Kiemenbogenarterien (Ma et al., 2016). Diese Zellen migrieren ab E13 in die prävalvulären Herzkissen und initiieren dann apoptotische Vorgänge in den umliegenden Mesenchymzellen sowie eine Reorganisation der extrazellulären Matrix, die zum Umbau der ursprünglich plumpen in feine Klappenblätter führt (Jain et al., 2011).

Ein nicht geringer Anteil der kardialen Neuralleistenzellen persistiert in den reifen Semilunarklappen als interstitielle Zellen (De Lange et al., 2004; Nakamura et al., 2006a; Jain et al., 2011; reviewed in Wu et al., 2017).

Für die Entstehung der Herzkissen im Ausflussteil sind, wenngleich weniger ausführlich untersucht, ähnliche molekulare und biomechanische Mechanismen von Bedeutung wie bei den Atrioventrikularkissen. Herzkissenbildung und epithelio-mesenchymale Transition des Ausflusstraktendokards wird genau wie im Atrioventrikularkanal durch erhöhte Scherspannung forciert. Bei abnormalen hämodynamischen Bedingungen verlaufen diese Prozesse nicht korrekt und es kommt zu Semilunarklappendefekten (Lindsay et al., 2015, Tibayan et al., 2015; Ford et al., 2016; Midgett et al., 2017a, b).

Molekular wird die vermehrte Synthese von Herzgallerte und die epithelio-mesenchymale Transition auch hier gesteuert u.a. von *BMP*-, *TGFβ*- und *Notch1*-, *Nfatc1*-, *VEGF*- und *EGF*-signalen (Lyons et al., 1990; Sugi et al., 2004b; Molin et al., 2003; Timmerman et al., 2004; Azhar et al., 2009; Wu et al., 2011; Stankunas et al., 2010; Iwamoto et al., 2003; MacGrogan et al., 2016). *BMP2* scheint hier allerdings keine so große Rolle zu spielen wie im Atrioventrikularkanal (Ma et al., 2005). Dafür exprimiert das Myokard im Ausflusstrakt in höherem Maße *BMP4*, aber auch *BMP6* und *7*, die funktionelle Redundanz aufweisen und für die Kissenbildung, Septierung und Klappenmorphogenese unerlässlich sind (Kim et al., 2001b).

Myokardiales *BMP4* und in Kissenmesenchymzellen exprimiertes *Tbx20* fördern Proliferation, Kissenexpansion und Remodellierung der extrazellulären Matrix (McCulley et al., 2008; Shelton und Yutzey, 2007).

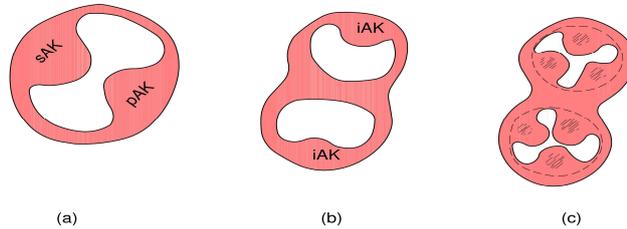
Endokardiales *GATA5* reguliert vermutlich über *Notch* und *eNOS3* die Bildung der Aortenklappe (Laforest et al., 2011).

Als nächstes fusionieren parietales und septales Herzkissen von distal nach proximal miteinander, wodurch der distale Ausflusstrakt in zukünftige intraperikardiale Aorten- und Pulmonalisstammkomponente geteilt wird. Unterstützt wird dieser Vorgang durch die Aortensackprotrusion, einer mesenchymalen Struktur, die vom Aortensack nach proximal in den Ausflusstrakt einwächst.

Indessen sind die interkalierenden Herzkissen an den gegenüberliegenden Wänden entstanden. Eines liegt kranial im zukünftigen Aortenteil, das andere befindet sich an der kaudalen Wand des zukünftigen pulmonalen Ausflusstrakts (Ya et al., 1998; Qayyum et al., 2001; Anderson et al., 2012) (siehe Abb.40, oben).

Ab E12.5 zeigen sich nach Entstehung des proximalen Ausflusstraktseptums in seinem distalen Bereich die Klappenprimordien in Form von drei Paaren kondensierter mesenchymaler Schwellungen. Auf der distalen Oberfläche jeder dieser Schwellungen entstehen durch von den kardialen Neuralleistenzellen induzierte Apoptose und Remodellierung der extrazellulären Matrix Kavitäten (Jain et al., 2011). Diese Kavitäten bilden durch weitere Kompaktierung und Remodellierung jeweils luminal ein Klappenblatt und mural die Wand des dazugehörigen Klappensinus.

Aus den interkalierenden Kissen entsteht jeweils entsprechend der Lokalisation ein Klappenblatt mit Sinus der Aorten- bzw. Pulmonalisklappe. Aus den zwei distal fusionierten proximalen Herzkissen entstehen je ein Klappenblatt mit Sinus für Aorten- und je ein Klappenblatt mit Sinus für die Pulmonalisklappe, sodass beide Arterien mit jeweils drei Klappenblättern einschließlich Sinus ausgestattet sind (Ya et al., 1998; Qayyum et al., 2001; Spicer et al., 2014) (siehe Abb.41).



**Abb.41:** Schema der Entstehung der Semilunarklappen, a- Fusion von parietalem und septalem Ausflusstraktkissen (pAK/sAK), b- Bildung der interkalierenden Ausflusstraktkissen (iAK), c- Kondensation und Kavitätenbildung in den mesenchymalen Klappenblatt-Vorläufern; eigene Darstellung

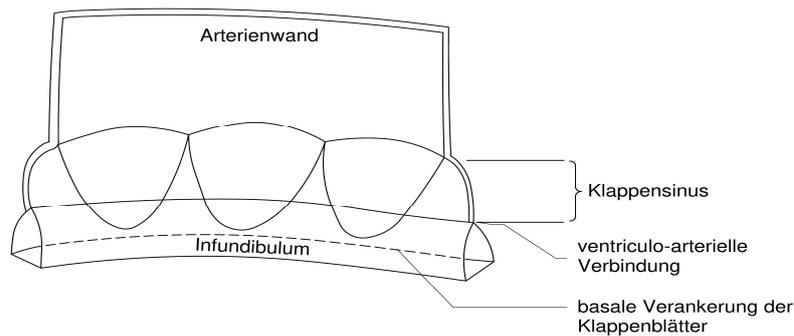
Während die Separierung von Aorta und Stamm der Arteria pulmonalis weiter nach proximal in Richtung des rechten Ventrikels voranschreitet, verlieren sie ihre myokardialen Hüllen und bilden vollständig voneinander getrennte Gefäße mit arteriellem Phänotyp. Die proximalsten Anteile von septalem und parietalem Herzkissen fusionieren letztlich auch. Das entstandene Septum zwischen dem Stamm von Aorta und Arteria pulmonalis muskularisiert anschließend durch Einwanderung von Kardiomyozyten aus der Wand des proximalen Ausflusstrakts und bildet einen Teil der dorsalen Wand des subpulmonalen Infundibulums (Ausflussbereich des rechten Ventrikels) (Lamers et al., 1995; Van den Hoff et al., 1999; Ya et al., 1998).

Durch das starke Wachstum v.a. des rechten Ventrikels kommt es zur Verbindung zwischen dem freien Rand der fusionierten proximalen Teile der Ausflusstraktkissen mit der rechtsventrikulären Fläche des Kamms des muskulären Ventrikelseptums. Auf diese Weise erlangt die Aorta eine zentrale Position zwischen rechtem und linkem Atrioventrikularkanal und Anschluss an den linken Ventrikel (Ya et al., 1998).

Ein Teil des myokardialen subaortalen ventrikulären Ausflussbereichs des linken Ventrikels, der aus der ursprünglichen inneren Krümmung hervorging, fibrotisiert zu einem späteren Zeitpunkt und bildet eine fibröse Kontinuität zwischen zwei Aortenklappenblättern und dem Aortenblatt der Mitralklappe, woher letztere ihren Namen bezieht. Beim Vogel hingegen behält diese Struktur ihren muskulären Charakter (Ya et al., 1998; Qayyum et al., 2001).

Die Differenzierung in dreischichtige fibröse Klappenblätter (s.o.) erfolgt nach einem ähnlichen Muster wie bei den Atrioventrikularklappen mit Stratifizierung der extrazellulären Matrix und verringerter Proliferation und unter Beteiligung von *TGFβ*-, *BMP*-, *Wnt*-Signalen sowie *Periostin* (Hinton et al., 2006 und 2010; McCulley et al., 2008; Joyce et al., 2009; Azhar et al., 2011; Alfieri et al., 2010).

Zhao et al. (2007) identifizierten den Atrioventrikularklappen entsprechende *BMP*- und *FGF4*-Signalwege, die auch bei den Semilunarklappen eine Diversifikation in knorpel- und sehnenartige Eigenschaften fördern. Diese den Klappenblättern eigene sehnenartige Eigenschaft und ihre halbmondförmige, recht langgezogene Aufhängung an den Arterienwurzeln gibt ihnen bei der verhältnismäßig geringen Größe ausreichende Elastizität und macht die Notwendigkeit von Chordae hinfällig (Spicer et al., 2014) (siehe Abb.42).



**Abb.42:** Verankerung und Form der Semilunarklappen, modifiziert nach Webb et al., 2003, Abb.2b

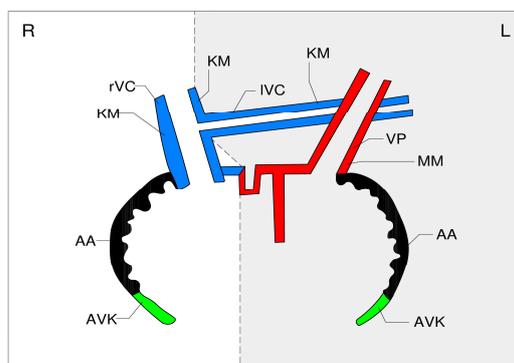
### 3.3.4 Septierung der Vor- und Hauptkammern

#### 3.3.4.1 Entstehung des Septum interatriale

Zu Beginn der Vorhofseptierung erlangen die im Sinus venosus mündenden anfänglich bilateral symmetrischen systemischen venösen Zuflüsse nach Remodellierung und Rotation über das Foramen sinuatriale Zutritt in die rechte Seite des gemeinsamen Atriums. Die noch solitäre Vena pulmonalis tritt von ventral über das persistierende dorsale Mesokard dicht oberhalb des Atrioventrikularkanal in die linke Seite des Atriums ein (Anderson et al., 2002; Schleich et al., 2009; reviewed in Anderson et al., 2016a).

Im Unterschied zu den Ventrikeln erfährt das primitive Atrium während des Loopings keine positionellen Veränderungen und behält dadurch seine ursprüngliche Links-rechts-Identität (Männer, 2000).

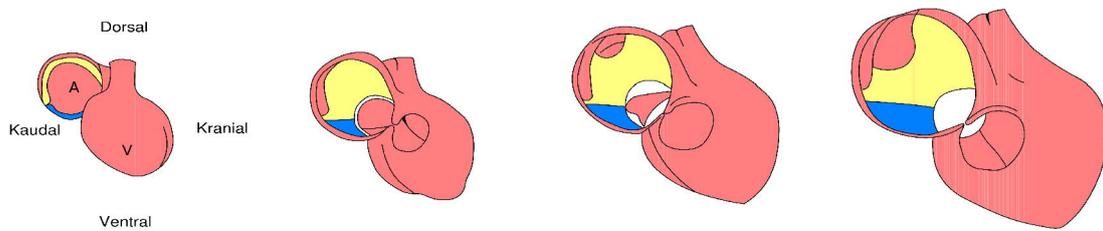
Franco et al. (2000) entdeckten vier, zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstehende, transkriptionale Domänen in den sich entwickelnden Atrien, die wiederum je eine linke und rechte Komponente, markiert durch die linksseitige *Pitx2*-Expression aufweisen: (1) das dem Atrioventrikularkanal entstammende Myokard (*MLC2v*-positiv), welches den glattwandigen unteren Rand der Atrien bildet, (2) die trabekulären atrialen Anhänge (*Anf*- und *MLC3F*-positiv), (3) das *MLC2v*- und *MLC3F*-positive Myokard, das die Vv. cavae und ihre Einmündung ins (rechte) Atrium umgibt, einschließlich der linken und rechten Venenklappenblätter und (4) das mediastinale Myokard (entspricht dem dorsalen Mesokard, gespeist aus dem Zweiten Herzfeld, exprimiert keinen der Marker), das sich aus dem Myokard der Vena pulmonalis, dem (primären) atrialen Septum, der dorsalen Einfaltung und dem sich vom Pulmonalveneneintritt bis zum linken Klappenblatt der Vv. cavae erstreckenden Myokard, zusammensetzt (siehe Abb.43).



**Abb.43:** Transkriptionale Domänen in den Atrien, grün: Myokard des Atrioventrikularkanal (AVK), schwarz: Myokard der atrialen Anhänge (AA), blau: Kavalvenenmyokard (KM), rVC /IVC- rechte/linke Vena cava, rot: mediastinales Myokard (MM), VP- Vena pulmonalis; modifiziert nach Franco et al., 2000

Diese Ergebnisse indizieren, dass das interatriale Septum wie auch die dorsomediale Wand der Atrien und die zukünftige Vena pulmonalis nicht dem ursprünglichen atrialen Myokard durch Proliferation desselben entstammen, sondern aus dem mesenchymalen Pool des Zweiten Herzfelds gespeist werden, das via dorsales Mesokard mit dem venösen Herzpol in Verbindung steht (Cai et al., 2003; Goddeeris et al., 2008).

Ab E9.5 wächst das Septum primum/interatriale vom Dach des noch gemeinsamen Atriums zwischen Foramen sinuatriale und dem Eintrittsort der zukünftigen Vena pulmonalis in Richtung Atrioventrikularkanal. Während der Fusion seiner am freien Rand befindlichen mesenchymalen Kappe mit dem kranialen Atrioventrikularkissen dringt von kaudo-ventral durch den rechten Rand der Pulmonalvenenöffnung eine weitere mesenchymale Struktur ins Atrium ein (Mommersteeg et al., 2006; Snarr et al., 2007b). Diese erstmals von His (1880) beschriebene und als Spina vestibuli angesprochene sogenannte dorsale mesenchymale Protrusion verschmilzt mit dem kaudalen Atrioventrikularkissen und allen anderen mesenchymalen Strukturen, wodurch die Teilung der Atrien am E11.5 bei der Maus vollständig ist. In der Folge muskularisieren mesenchymale Kappe und dorsale mesenchymale Protrusion und bilden den ventralen Stützpfeiler zwischen rechtem und linkem Atrium bzw. des zukünftigen Foramen ovale (Anderson et al., 2002; Mommersteeg et al., 2006; Snarr et al., 2007b; Briggs et al., 2012; Anderson et al., 2015; Mori et al., 2016) (siehe Abb.44)



**Abb.44:** Septierung der Vorhöfe, A- Atrien, V- Ventrikel, rot: Myokard, gelb: Septum primum, blau: dorsale mesenchymale Protrusion (DMP), weiß: mesenchymale Gewebe, modifiziert nach Schleich et al., 2009, Abb.9

*Hedgehog*-Signale aus dem pulmonalen Entoderm, aus dem sich die Lunge entwickelt, spezifizieren Progenitoren der atrialen Septen und der dorsalen mesenchymalen Protrusion hinsichtlich ihrer prospektiven septalen Identität, fördern deren Proliferation und scheinen darüberhinaus auch für die Migration und Differenzierung der atrialen Precursor notwendig zu sein (Goddeeris et al., 2008; Hoffmann et al., 2009, 2014, 2016). *GATA4*-Aktivität im Zweiten Herzfeld verstärkt den *Hedgehog*-Signalweg (Zhou et al., 2017). Die Lungenanlage selbst gibt also die Signale, die erst eine vollständige Trennung von systemischer und pulmonaler Zirkulation gewährleisten, ein interessanter evolutionsbiologischer Aspekt.

In der kaudalen Herzregion stark exprimierter *Tbx5* fördert ebenfalls die Proliferation der Atrienseptum-Vorläufer im Zweiten Herzfeld stromaufwärts und parallel zu *Hedgehog* (Xie et al., 2012). In den Myozyten der Atrien und des atrialen Septums wird *Tbx5* koexprimiert mit *GATA4* und *Krüppel-like factor 13 (KLF13)*. Die Transkriptionsfaktoren interagieren physikalisch und funktionell miteinander zur Aktivierung einer Reihe herzspezifischer Gene (Misra et al., 2014; Ang et al., 2016b; Darwich et al., 2017).

Auch *Wnt2*-induzierte  $\beta$ -*Catenin*- sowie *Notch*-Signale sind für die Rekrutierung von Mesenchymzellen aus dem Sekundären Herzfeld in das Atrienseptum von Bedeutung (Lin et al., 2007; High et al., 2009).

Noch vor der Fusion der mesenchymalen septalen Gewebe im Atrium haben sich am oberen Rand des Septum primum durch Apoptose konfluierende Fenestrierungen gebildet. Was die Apoptose induziert, ist noch unklar. Man weiß allerdings, dass endokardial exprimiertem

*Tbx5* in Interaktion mit *GATA4* und *endokardialer Stickoxidsynthase 3 (eNOS3)* eine Apoptose-begrenzende Funktion im Septum primum zukommt. *Tbx5* und *GATA4* aktivieren ein antiapoptotisches Gen in den Septumzellen. *eNOS3*, ein Zielgen von *Tbx5*, fördert die Produktion von Stickstoffmonoxid, einem Apoptoseinhibitor (Dimmeler et al., 1997; Nadeau et al., 2010). *Tbx5*-Deletion im Endokard des Septums führt zu exzessiver Apoptose im Septum primum und nachfolgend zum Defekt des atrialen Septums (Nadeau et al., 2010).

Ab E13 faltet sich bei Maus und Mensch, jedoch nicht beim aviären Embryo, die dorso-kaudale Wand der Atrien zwischen der linken Venenklappe der systemischen venösen Zuflüsse und dem Septum primum ein. Diese Einfaltung bildet den oberen Rand des Foramen ovale bzw. der Fossa ovalis und einen Stützpfeiler für die durch das Septum primum verkörperte Klappe zwischen rechtem und linkem Vorhof (Webb et al., 1998; Anderson et al., 2002; Schleich et al., 2009; reviewed in Gittenberger de Groot et al., 2014).

Nach aktuelleren Forschungsergebnissen wurde diese Struktur in ihrer Ausdehnung und Bedeutung in (älteren) Lehrbüchern stark überschätzt, weshalb auch die Bezeichnung „Septum secundum“ als überholt erachtet wird. Stattdessen werden die Namen „perikardialer transverser Sinus“ und „kaudodorsale interatriale Grube“ (sinngemäß) ins Feld geführt (Anderson et al., 2015; Mori et al., 2016; Anderson et al., 2016a). Konsequenterweise erfordert diese Ansicht auch ein Ersetzen des Begriffs „Septum primum“ durch den Terminus „Septum interatriale“.

#### 3.3.4.2 Bildung des Septum interventriculare

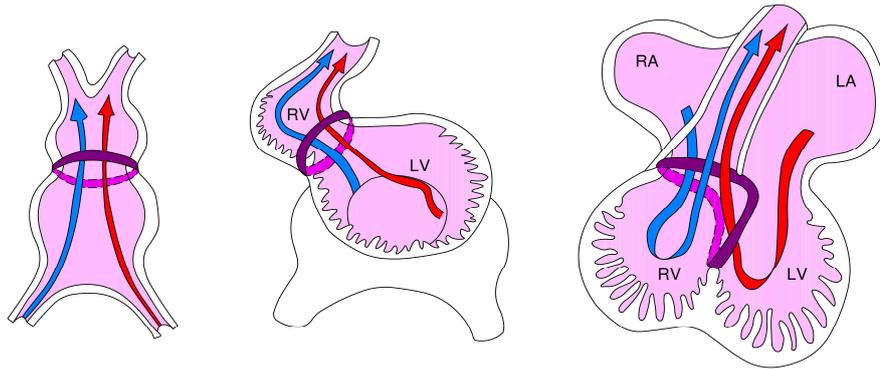
Das primäre interventrikuläre Septum entsteht mit Bildung der Trabekel und dem Vorwölben der zukünftigen Ventrikel ab E11 bzw. bei HH18.

Das Myokard des zwischen rechtem und linkem primitiven Ventrikel befindlichen, äußerlich durch die interventrikuläre Furche abgesetzten, interventrikulären Foramens lässt sich beim Menschen durch einen *GIN-Epitop*-Antikörper markieren und kennzeichnet die Precursor des ventrikulären Erregungsleitungssystems (De la Cruz et al., 1997; Wessels et al., 1992; Kim et al., 2001a; reviewed in Christoffels et al., 2000a; reviewed in Gittenberger de Groot et al., 2014). An Hand dieser ringförmigen, als Primärring bezeichneten Markierung zwischen zukünftigem rechten und linken Ventrikel lassen sich die für die korrekte Ausbildung des Septums erforderlichen Remodellierungsvorgänge an der inneren Kurvatur gut nachvollziehen (siehe Abb.45).

Stadtfield et al. (2007) identifizierten bei der Maus eine vergleichbare ringförmige Markierung in Form von transientser *LysozymM*-Expression.

Die Demarkierungslinie zwischen *Tbx5*, dessen Expression sich nach dem Looping auf die sinuatriale Region und den linken Ventrikel beschränkt, und *Tbx20*, der spezifisch im rechten Ventrikel exprimiert wird, legt die Position des Ventrikelseptums fest. Überexpression von *Tbx5* verdrängt die *Tbx20*-Expressionsdomäne und führt zu defizitärer Ausbildung von Septum und rechtem Ventrikel (Yamada et al., 2000; Takeuchi et al., 2003). Ebenso scheint die Abwesenheit des bei der Maus spezifisch linksventrikulär exprimierten Transkriptionsfaktors *eHAND* in der Grenzregion eine Voraussetzung für die korrekte Ausbildung des Septum interventriculare zu sein (Togi et al., 2004).

Während der Fusion der Atrioventrikularkissen vergrößert sich v.a. der rechte Atrioventrikularkanal zur atrialen Seite hin. Diese Expansion betrifft auch das *GIN*-positive Gewebe, das in der Folge den rechten Atrioventrikularkanal umgibt. Dadurch wird das rechtsventrikuläre Einlassegment geschaffen und der rechte Atrioventrikularkanal über dem rechten Ventrikel positioniert. Das muskuläre Septum interventriculare gelangt in die Nähe des mesenchymalen, atrioventrikulären Septums (Lamers et al., 1995) (siehe Abb.45).



**Abb.45:** Remodellierungsvorgänge an der inneren Kurvatur, die zur korrekten Konfiguration der Ein- und Ausflussbahn des Herens führen, RA/LA- rechtes/linkes Atrium, RV/LV- rechter/linker Ventrikel, roter Pfeil: „linke“ Blutstrombahn, blauer Pfeil: „rechte“ Blutstrombahn, violetter Ring: Primärring; modifiziert nach Moorman und Christoffels, 2003, Abb.8

Die in Lehrbüchern verwendeten Bilder zur Septierung der Ventrikel suggerieren, wie es auch früheren Vorstellungen entsprach, das Septum interventriculare wachse aktiv in Richtung des Atrioventrikularkanal (Harh und Paul, 1975; De la Cruz et al., 1997; Hyttel et al., 2010; Rüsse und Sinowatz, 1998 und 2015). Diese Ansicht ist jedoch bereits seit längerem weitgehend widerlegt.

In Folge der zentrifugalen Expansion der Ventrikel ab E11/HH18 kommt es zur Apposition und Fusion der noch wenig verzweigten, blattförmigen Trabekel von linkem und rechtem Ventrikel luminal im Bereich der interventrikulären Furche (Goor et al., 1970; Stadtfeld et al., 2007; Contreras-Ramos et al., 2008; Poelmann et al., 2014; Captur et al., 2016). Das Epikard bzw. „epicardium-derived cells“, die über die innere Kurvatur auch in den Sulcus interventricularis einwandern und im Inneren des prospektiven Septums persistieren, scheinen für diesen Vorgang unerlässlich zu sein (Gittenberger de Groot et al., 1998; Mahtab et al., 2008; Poelmann et al., 2014).

Während von den apikalen, stark proliferierenden Ventrikelwänden Myokardzellen ins Septum „nachgeschoben“ werden, dieses sich folglich „passiv“ in Gegenrichtung zum Atrioventrikularkanal verlängert, unterliegt sein basaler Teil zunehmend der myokardialen Differenzierung. Diese Kompaktierung und Differenzierung setzt sich in apikale Richtung fort. Das ursprüngliche Foramen interventriculare verändert seine Größe nicht, was diese Ansicht untermauert (Franco et al., 2006; Contreras-Ramos et al., 2008 und 2009; Gerhardt et al., 2013; Poelmann et al., 2014).

Am E13.5 bzw. HH28 kommt es durch die Fusion zwischen atrioventrikulärem Septum, dem proximalen Anteil des Ausflusstraktseptums und dem Kamm des muskulären Ventrikelseptums zum vollständigen Verschluss des interventrikulären Foramens (De la Cruz et al., 1997; Kim et al., 2001a; Stadtfeld et al., 2007; Contreras-Ramos et al., 2008). Man unterscheidet dann drei Komponenten am Septum interventriculare: 1. das trabekuläre Septum kranial und ventral, das zu etwa gleichen Teilen aus links- und rechtsventrikulären Kardiomyozyten hervorgeht, 2. das zunächst mesenchymale, später myokardiale proximale Ausflusstraktseptum kranial und 3. das Einlasseptum kaudal unterhalb des ursprünglichen kaudalen Atrioventrikularkissens, dessen separater Ursprung allerdings nicht unstrittig ist (Gittenberger de Groot et al., 2014).

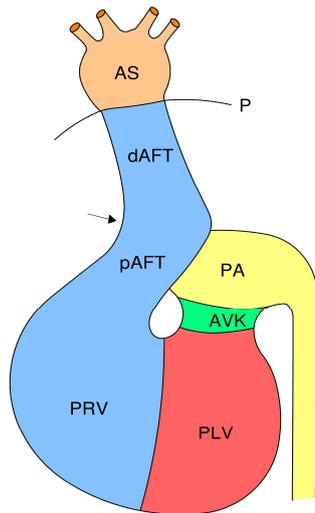
Das definitive Ventrikelseptum ist zu etwa einem Drittel aus mesenchymalem Gewebe (basal, sogenannte Pars membranacea) und zu etwa zwei Dritteln aus Myokard (apikal, sogenannte Pars muscularis) zusammengesetzt und entstammt überwiegend dem Zweiten Herzfeld (Lamers et al., 1995; Kim et al., 2001a; Meilhac et al., 2004b; Verzi et al., 2005; Franco et al., 2006; Contreras-Ramos et al., 2008).

Die Entstehung des Kammerseptums ist eng verknüpft mit dem Looping, der Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Zweiten Herzfeld, der myokardialen Proliferation sowie der Fusion der endokardialen Kissen. Regulatorische Defizite in diesen Aspekten führen daher (auch) zu Defekten des interventrikulären Septums. Zur Aufarbeitung der regulatorischen Netzwerke sei auf die Abhandlung in den entsprechenden Kapiteln verwiesen.

## 3.4 Die weitere Entwicklung des arteriellen Herzpols

### 3.4.1 Gültige Erkenntnisse und kontroverse Anschauungen

Zu Beginn der Septierung erstreckt sich der myokardiale Ausflusstrakt von der Ventrikelbasis bis zur perikardialen Grenze, von wo aus er in den Aortensack, den „Verteiler“ der Kiemenbogenarterien, übergeht. Er lässt sich morphologisch durch die Krümmung in eine proximale, ventrikelnahe, und eine distale, dem Aortensack naheliegende, Komponente unterteilen (Männer, 2000) (siehe Abb.46).



**Abb.46:** Konfiguration des Herzens zu Beginn der Ausflusstraktseptierung, AS: Aortensack, dAFT- distaler Ausflusstrakt, pAFT- proximaler Ausflusstrakt, PRV/PLV: primitiver rechter/linker Ventrikel, AVK: Atrioventrikularkanal, PA: primitives Atrium, P: Grenze der Perikardhöhle, Pfeil bezeichnet sog. „Hundebein-artige“ Krümmung; modifiziert nach Okamoto et al., 2010, Abb.1D

Die Fusion der sich spiralg umeinander windenden parietalen und septalen Ausflusstraktkissen von distal nach proximal in Zusammenspiel mit einer der Dorsalwand des Aortensacks entspringenden mesenchymalen Trennwand bewirkt letztlich die Trennung in Aorten- und Truncus pulmonalis-Ausflussbahn, deren Wände später einen arteriellen Phänotyp akquirieren. Die Aortenwurzel wird so mit der remodellierten linken vierten (beim Huhn mit der rechten vierten) Kiemenbogenarterie und die Wurzel des Truncus pulmonalis mit der remodellierten linken sechsten Kiemenbogenarterie verbunden.

Ein Teil der linken sechsten Kiemenbogenarterie wird in den zwischen beiden großen Arterien eine Verbindung herstellenden Ductus arteriosus umgebaut, der nach der Geburt obliteriert (Ya et al., 1998; Rüsse und Sinowatz, 1998 und 2015; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010).

Die Morphogenese des Ausflusstrakts ist Gegenstand anhaltender Kontroversen. Die verwirrende Diversität der Terminologie hinsichtlich seiner Komponenten, Anzahl, Bezeichnung und Fusionsmuster seiner Endokardkissen und die durch hohe Dynamik erschwerte Zuordnung von Ortsbezeichnungen machen ein grundlegendes Verständnis unzugänglich (Webb et al., 2003; Okamoto et al., 2010; Sizarov et al., 2012).

Der Verständlichkeit halber werden die Begriffe des proximalen und distalen Ausflusstrakts den veralteten Bezeichnungen des Bulbus cordis und Truncus arteriosus vorgezogen. In Konsequenz wird von Ausflusstraktkissen (parietal und septal, nach ihrer Ansatzstelle an der Ventrikelbasis) gesprochen. Diese kann man noch einmal in proximale und distale Anteile gliedern (Männer, 2000).

Dem Verständnis abträglich ist auch die inhomogene Verwendung der Bezeichnung des Septum aorticopulmonale, das ursprünglich für die Aortensackprotrusion steht (Van Mierop, 1978, 1979). Einige Forscher integrieren auch die distalen Ausflusstraktkissen in diese Begrifflichkeit (Waldo et al., 1998; Kelly et al., 2007).

Wieder andere sprechen vom Aorticopulmonal-Septal-Komplex, an dem auch die proximalen Ausflusstraktkissen beteiligt sind (Thompson et al., 1987). Um Unklarheiten vorzubeugen, wird daher der Begriff der unmissverständlich zuzuordnenden „Aortensackprotrusion“ dem des „Septum aorticopulmonale“ vorgezogen (in Anlehnung an Anderson et al., 2012).

Widerlegt wurde die herkömmliche Annahme, der myokardiale Mantel des Ausflusstrakts verschwände überwiegend durch Apoptose oder Transdifferenzierung in glatte Muskelzellen der Gefäße (Arguello et al., 1978; Watanabe et al., 1998; Ya et al., 1998; Yang et al., 2004). Das Myokard des Ausflusstrakts zieht sich vielmehr durch Inkorporation in den rechten Ventrikel zurück, die Vorläufer für die glatte Muskulatur der Wände der großen Gefäße werden aus dem Zweiten Herzfeld rekrutiert (Rana et al., 2007; Sizarov et al., 2012).

Die Behauptung, eine Rotation des Ausflusstrakts spiele keine Rolle für die korrekte Konfiguration der großen Arterien, hat sich ebenfalls als inkorrekt erwiesen (Webb et al., 2003; Okamoto et al., 2010; Sizarov et al., 2012).

Die Bedeutung von kardialen Neuralleistenzellen, einer extrakardialen Zellpopulation für die Ausflusstraktseptierung, wurde lange Zeit unterschätzt und lediglich auf die Septenbildung ohne Verbleib einer nennenswerten Anzahl in den Gefäßwänden reduziert, was nach heutiger Auffassung unzutreffend ist (Kirby et al., 1983; Anderson et al., 2012).

### 3.4.2 Regulatorische Netzwerke im Zweiten Herzfeld mit Bedeutung für die Entwicklung des Ausflusstrakts

Nach der Entstehung des geraden Herzschlauchs bildet das Zweite Herzfeld die Hauptquelle kardiogener Progenitoren. Aus ihm rekrutieren sich die Vorläufer für Atrien, Teile des Atrioventrikularkanals, einen Teil des Ventrikelseptums, den rechten Ventrikel sowie den Ausflusstrakt (Waldo et al., 2001; Kelly et al., 2001; Cai et al., 2003; Meilhac et al., 2004a).

Das Zweite Herzfeld erstreckt sich vom viszeralem Mesoderm der kaudodorsalen Perikardhöhlenwand unterhalb des Vorderdarms bis in das Kiemenbogenmesoderm kranial (Kelly et al., 2001). Seine durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Isl1* und *Nkx2.5* sowie des *VEGF*-Rezeptors *Flk1* (*Fetal liver kinase 1*, Marker für kardiogene Progenitoren und Endothel) gekennzeichneten multipotenten Stammzellen können sich in vaskuläre glatte Muskelzellen, Kardiomyozyten oder Endothel-/Endokardzellen differenzieren (Hutson et al., 2010).

Die anteriore, durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Tbx1* (*Tbox1*), *FGF* (*Fibroblast Growth Factor*) *8/10* und *Mef* (*Myocyte enhancing factor*) *2C* charakterisierte Unterdomäne des Zweiten Herzfelds wird als Anteriore Herzfeld bezeichnet und trägt vorwiegend zur Entwicklung des arteriellen Herzpols bei (Mjaatvedt et al., 2001; reviewed in Kelly et al., 2005; Cai et al., 2003; Verzi et al., 2005; Park et al., 2006; Stadtfeld et al., 2007). Im folgenden sollen grundlegende, weitgehend aufgeklärte Signalwege im Zweiten/Anterioren Herzfeld erörtert werden, die für die Morphogenese des Ausflusstrakts von Bedeutung sind.

Durch *kanonische Wnt*-Signale/ $\beta$ -*Catenin* induzierte *Isl1*-Expression ist die Voraussetzung für Proliferation und Migration von Vorläuferzellen des Ausflusstrakts und der Kiemenbogenarterien im Zweiten Herzfeld (Lin, L.Z. et al., 2007).

Der im pharyngealen Ento-, Meso- und Ektoderm exprimierte *Tbox*-Transkriptionsfaktor *Tbx1* gilt zusammen mit *Isl1* als bedeutender Regulator des Anterioren Herzfelds und der Kiemenbogenarterienentwicklung (Cai et al., 2003; Zhang et al., 2005; Xu et al., 2005). Entgegen früherer Annahmen ist *Tbx1* auch bzw. primär im posterioren Zweiten Herzfeld aktiv und induziert nicht nur die kraniale Expansion des Zweiten Herzfelds, sondern koordiniert sowohl die Segregation von Vorläuferzellen zum arteriellen als auch zum venösen Pol (Rana et al., 2014).

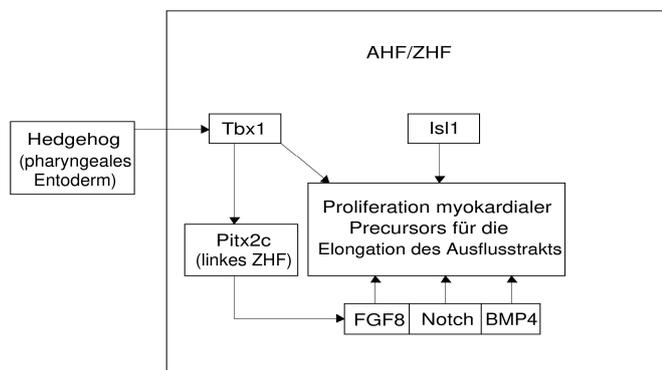
*Hedgehog*-Signale aus dem pharyngealen und dem pulmonalen Entoderm, die die Vorläuferzellen von zukünftigem Truncus pulmonalis und intraperikardialer Aorta zu spezifizieren scheinen, aktivieren *Tbx1* über *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren (Garg et al., 2001; Hu et al., 2004; Hoffmann et al., 2009; Liang et al., 2014). Die korrekte Expression von *Tbx1* zwischen E8.5 und E9.5 ist notwendig für die Elongation des myokardialen Ausflusstrakts (Xu et al., 2005). Weiterhin kontrolliert *Tbx1* maßgeblich die Entwicklung der inferioren Wand des Ausflusstrakts, des späteren subpulmonalen Myokards (Theveniau-Ruissy et al., 2008). *Tbx1* wird transient asymmetrisch exprimiert und scheint über Interaktion mit *Nkx2.5* ein wichtiger Regulator der linksseitig asymmetrischen *Pitx2c*-Expression zu sein. Das korrekte Zusammenspiel von *Tbx1* und *Pitx2c* ist entscheidend für die richtige Positionierung von Aorta und Truncus pulmonalis (Nowotschin et al., 2006).

*Pitx2c* beeinflusst auch Rekrutierungs- und Remodellierungsvorgänge mesodermaler Vorläuferzellen im Ausflusstrakt mittels Regulierung der *FGF8*-, *Notch*- und *BMP4*-Expression (Ma et al., 2013).

Trotz teilweise überlappender Expression und Funktion im Anterioren Herzfeld spielt *FGF8* als Förderer der Proliferation eine bedeutendere Rolle in der Entwicklung von Ausflusstrakt und Kiemenbogenarterien als *FGF10* (Kelly et al., 2001; Watanabe et al., 2010 und 2012).

*Notch*-Signale sind an der Regulation von *FGF8* und *BMP4*, den bedeutendsten Förderern der Proliferation im Anterioren Herzfeld beteiligt (McCulley et al., 2008; High et al., 2009; Thomas et al., 2014).

Darüberhinaus scheinen *Notch*-Signal-vermittelte Interaktionen der Zellen des Anterioren Herzfelds mit den bei der Maus ab E 9.5 dort hindurch migrierenden kardialen Neuralleistenzellen für die korrekte Septierung des Ausflusstrakts unerlässlich zu sein (High et al., 2009; Jain et al., 2009) (siehe Abb.47).



**Abb.47:** Transkriptionale Regulation im Zweiten bzw. Anterioren Herzfeld; Tbx1: Tbox 1, Isl1: Islet-1, Pitx2C: Pituitary homeobox 2C, FGF8: Fibroblast Growth Factor 8, BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4, nähere Erläuterungen im Text; eigene Darstellung

*Fibronektin*- und Rezeptor *Integrin alpha2*-abhängige Zelladhäsion im Zweiten Herzfeld sind unerlässlich sowohl für die Proliferation myokardialer Progenitoren als auch für die Vermittlung von *FGF8*-Signalen (Mittal et al., 2013).

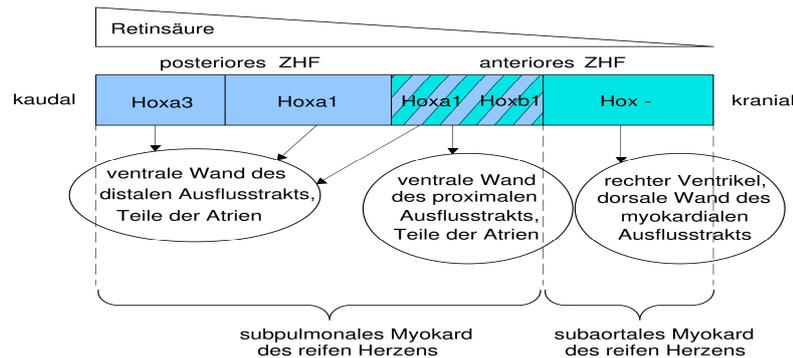
Der kaudokraniale *Retinsäure*-Gradient spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung positioneller Identitäten entlang der antero-posterioren Achse im Zweiten Herzfeld.

Die *Retinsäure*-Expression legt die posteriore Grenze des Zweiten Herzfelds fest, induziert die Segregation und regionale Spezifikation der Progenitoren durch das Zeitpunkt- und Konzentrations-abhängige Anschalten von *Hox*-Genen (Ryckebusch et al., 2008; Bertrand et al., 2011; Soshnikova et al., 2013).

Von kranial nach kaudal lassen sich folgende *Hox*-Domänen unterscheiden: (1) *Hox*-negativ, (2) *Hoxb1* positiv, (3) *Hoxa1*, (4) *Hoxa3*. Über die Funktionsweise dieser stark konservierten

Homöodomänen-Proteine im Rahmen der Kardiogenese ist noch wenig bekannt. Man geht aber davon aus, dass sie, da sie selbst nur geringe Affinität zu DNA-Sequenzen besitzen, mittels Co-Faktoren *Pbx* und *Meis*, ebenfalls Homöodomänen-Proteine, ihre Aktivität ausüben (Chang et al., 2008; Stankunas et al., 2008; Soshnikova et al., 2013; reviewed in Ladam und Sagerstrom, 2014).

Aus den *Hox*-negativen Progenitoren gehen rechter Ventrikel und dorsale Wand des Ausflusstrakts hervor; aus *Hoxb1*-Vorläufern entstehen die ventrale Wand des proximalen Ausflusstrakts und Teile der Atrien; aus *Hoxa1*- und *Hoxa3*-Vorläuferzellen entwickeln sich die ventrale Wand des distalen Ausflusstrakts und Teile der Atrien (Bertrand et al., 2011) (siehe Abb.48).



**Abb.48:** Hox-Domänen im Zweiten Herzfeld (ZHF) in Abhängigkeit von der Retinsäure-Konzentration und Beitrag ihrer Vorläuferzellen zum Ausflusstrakt, Hox-/a1/a3/b1: im Zweiten Herzfeld (ZHF) aktive Homöoboxgene, weitere Erläuterungen im Text; eigene Darstellung

Die Subdomänen des Zweiten Herzfelds werden also fortschreitend von kranial nach kaudal in den arteriellen Pol des Herzens inkorporiert, was sich in ihren proximo-distalen Verteilungsmustern im Ausflusstrakt widerspiegelt. Darüberhinaus zeigen mehrere Studien auch, dass entgegen früherer Annahmen kardiogene Precursor aus dem kranialen Zweiten Herzfeld auch zur Genese des venösen Herzpols beitragen vice versa (Van den Berg et al., 2009; Bertrand et al., 2011; Dominguez et al., 2012).

Die Grenzen sowohl zwischen den transkriptionalen Domänen des Zweiten Herzfelds als auch zum umgebenden Gewebe sind nicht statisch. So ist z.B. auch ein Teil der benachbarten pharyngealen Entodermzellen in der Lage, nach Zellformveränderung und unter Expression von *Isl1* in den Progenitor-Pool des Zweiten Herzfelds einzuwandern und zur Herzmorphogenese beizutragen (Engleka et al., 2005, 2012).

### 3.4.3 Die Separierung des Ausflusstrakts

#### 3.4.3.1 Entwicklung der Kiemenbogenarterien

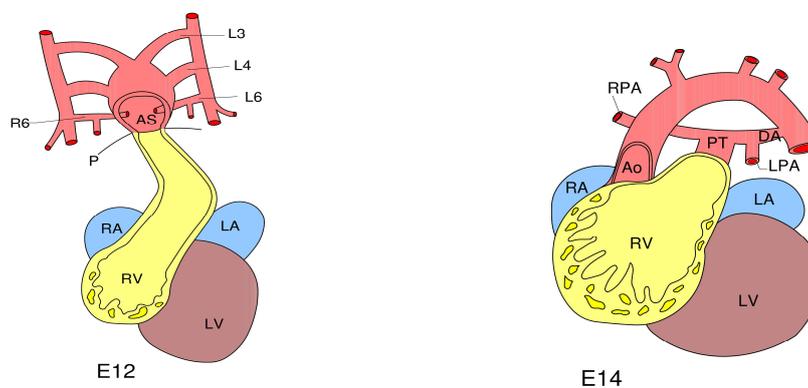
Aus dem im pharyngealen Mesoderm eingebetteten Aortensack entspringen ab dem Looping von kranial nach kaudal sukzessive sechs paarige, bilateral symmetrische Arterien, die sogenannten Kiemenbogenarterien (Synonym: Aortenbogenarterien) 1 bis 6, die von ventral den Vorderdarm umgebend eine Verbindung zwischen Ausflusstrakt und dorsaler Aorta herstellen (Hiruma und Hirakow, 1995).

Die fünften Kiemenbogenarterien sind allerdings bei Vögeln und Säugern nur rudimentär angelegt und treten bei einem Teil der Individuen nie in Erscheinung (Hiruma et al., 2002; Bamforth et al., 2013).

Die Kiemenbogenarterien unterliegen spezies-spezifischen asymmetrischen Regressions- und Remodellierungsvorgängen, die eine Grundvoraussetzung für die richtige Konfiguration von Aorta und Arteria pulmonalis sind. Letztlich persistieren lediglich Kiemenbogenarterienpaare drei, vier und sechs.

Beim Säuger bildet die linke vierte Kiemenbogenarterie den Hauptteil des reifen Aortenbogens, der die von der linken Herzkammer kommende Aorta ascendens mit der dorsalen Aorta verbindet (Hiruma et al., 2002), wohingegen beim Huhn die rechte vierte Kiemenbogenarterie das Hauptsegment des reifen transversen Aortenbogens bereitstellt (Hiruma und Hirakow, 1995).

Die neu entstehende rechte und linke Lungenarterie erlangt Anschluss an die ipsilateralen sechsten Kiemenbogenarterien und somit Verbindung zu dem der rechten Herzkammer entspringenden zukünftigen Truncus pulmonalis. Während sich die rechte sechste Kiemenbogenarterie später zurückbildet, vergrößert sich die linke und bildet einen Teil des Ductus arteriosus (Bramforth et al., 2013) (siehe Abb.49).



**Abb.49:** Remodellierung der Kiemenbogenarterien, AS: Aortensack, P: Perikard, RV/LV: rechter/linker Ventrikel, RA/LA: rechtes/linkes Atrium, PT: Truncus pulmonalis, DA: Ductus arteriosus, LPA: linke Arteria pulmonalis, RPA: rechte Arteria pulmonalis; modifiziert nach Okamoto et al., 2010, Abb.3B und 3G

Das Endothel der Kiemenbogenarterien entsteht aus Vorläuferzellen des Zweiten Herzfelds, die die hierfür typischen Marker *Isl1*, *Tbx1* und *FGF8/10* exprimieren (Wang et al., 2017). Die glatte Gefäßmuskulatur wird aus kardialen Neuralleistenzellen gebildet. Sie grenzt nach medial an das pharyngeale Entoderm und nach lateral an pharyngeales Ektoderm, Gewebe, die als wichtige Signalgeber für die Entwicklung dieser Gefäße fungieren (Jiang et al., 2000; Brown et al., 2004; Watanabe et al., 2010).

Die *Pitx2*-induzierte Aktivität im linseitigen Zweiten Herzfeld reguliert die asymmetrische Morphogenese des Ausflusstrakts. Der dadurch bedingte asymmetrische Blutfluss durch rechte versus linke Kiemenbogenarterien ist maßgeblich verantwortlich für die korrekte Remodellierung in Form von Dominanz und Wachstum eines Gefäßzweigs im Gegensatz zu Regression eines anderen Gefäßzweigs (Hu et al., 2009; Kowalski et al., 2012, 2013). Potentielle Mediatoren dieses Remodelings sind *VEGF*- und *PDGF*-Signale (Yashiro et al., 2007).

Die Aktivität der *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren *FoxC1* und *FoxC2*, positiven Regulatoren der *Tbx1*- und *FGF8/10*-Expression, im pharyngealen Mesenchym ist ebenfalls an der Remodellierung der Kiemenbögen und der Septierung des Ausflusstrakts beteiligt (Kume et al., 2001; Seo und Kume, 2006; Uddin et al., 2015).

### 3.4.3.2 Septierung des Ausflusstrakts und Entstehung der Gefäßwände von Aorta und Truncus pulmonalis

Der primitive, noch gänzlich von *Isl1*-exprimierendem Myokard umgebene, lediglich eine transiente Struktur beschreibende Ausflusstrakt besteht bei HH18 (Huhn)/E9 (Maus) aus einem proximalen und einem distalen Teil, die durch eine Krümmung voneinander getrennt sind (Ya et al., 1998; Waldo et al., 2001; Cai et al., 2003; Waldo et al., 2005b).

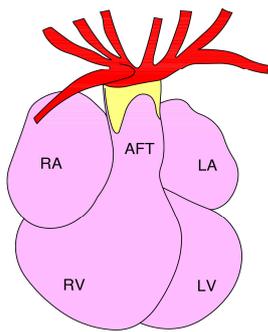
Seine unter Kontrolle von *Tbx1* stehende Elongation unter Akquisition myokardialer Vorläuferzellen aus dem Zweiten Herzfeld ist bei HH21 bzw. E9.5 abgeschlossen (Mjaatvedt et al., 2001; Kelly et al., 2001; Xu et al., 2005).

Zu diesem Zeitpunkt hat der noch ungeteilte Ausflusstrakt nur zur sich entwickelnden rechtsventrikulären Komponente der Ventrikelschleife eine direkte Verbindung. An den distalen Teil schließt sich nach kranial der extraperikardial gelegene Aortensack an (siehe Abb.49 links).

Das primäre Myokard des primitiven Ausflusstrakts wird ab E10 zunehmend durch Differenzierung in rechts-ventrikuläres Myokard und unter Verlust der *Isl1*-Expression in den wachsenden rechten Ventrikel inkorporiert. Der programmierte Zelltod von Kardiomyozyten spielt in diesem Stadium noch eine untergeordnete Rolle (Rana et al., 2007). Während sich der myokardiale Ausflusstrakt dadurch stark verkürzt, wandern vom distalen Rand der Perikardhöhle nicht-myokardiale Zellen aus dem pharyngealen Mesoderm (Zweites/Anteriores Herzfeld) in die Regionen zwischen den Aufflusstraktkissen ein und ersetzen das Myokard (Rana et al., 2007; Sizarov et al., 2012).

*Retinsäure* spielt für die Bereitstellung von Vorläuferzellen in dieser Phase eine wichtige Rolle (Li et al., 2010). Wichtige Ziele von *Retinsäure* sind hierbei die Gene der Wachstumsfaktoren *TGFβ2* und *FGF8/10* (Kubalak et al., 2002; Ryckebusch et al., 2008; Li et al., 2010).

Die *Isl1*-exprimierenden Vorläuferzellen infiltrieren die Wand des Ausflusstrakts ab E10.5 anfänglich in Form zweier gegenüberliegender Säulen, um sich später im Laufe der Neuralleistenzellinvasion in glatte Muskelzellen der Gefäßwände zu differenzieren (Sizarov et al., 2012; Anderson et al., 2012) (siehe Abb.50).



**Abb.50:** Invasion *Isl1*-positiver SHF-Vorläuferzellen in den primitiven myokardialen Ausflusstrakt (AFT) am E10.5, RA/LA: rechtes/ linkes Atrium, RV/LV: rechter/ linker Ventrikel, rosa: Myokard, gelb: *Isl1*+ -Precursors, rot: Kiemenbogenarterien; modifiziert nach Anderson et al., 2012. Abb.1G

Die interkalierenden Kissen, deren mesenchymale Zellen ebenfalls *Isl1* exprimieren, entstehen in Kontinuität zu den nicht-myokardialen Säulen, weshalb ein gemeinsamer Ursprung mit diesen vermutet werden kann (Sizarov et al., 2012).

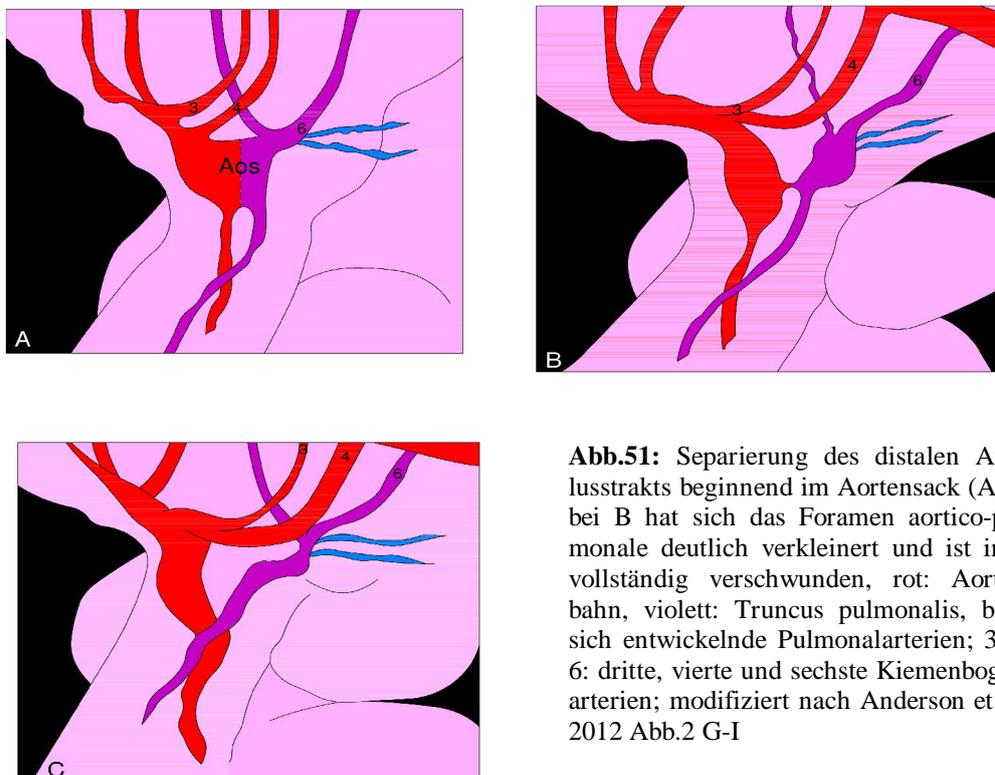
Ab E11.5 beginnt die Teilung des Aortensacks durch eine überwiegend *AP2* (*Activating Protein 2*, Marker migrierender Neuralleistenzellen) und *SMA* (*Smooth Muscle alpha Actin* - Marker glatter Muskulatur), nicht jedoch *Isl1* exprimierende, von Neuralleistenzellen verkörperte Protrusion seiner dorsalen Wand. Dieses ursprünglich als Septum aortico-pulmonale bezeichnete Gewebe entspringt zwischen den vierten und sechsten

Kiemenbogenarterien und erstreckt sich bis in den distalen Ausflusstrakt hinein (Anderson et al., 2012).

Der ehemalige Aortensack existiert nun als Teil der Aorta ascendens mit Verbindung zu den vierten Kiemenbogenarterien. Links kaudal davon verläuft separat der distale Truncus pulmonalis mit Anschluss an die sechsten Kiemenbogenarterien und die Pulmonalarterien (Anderson et al., 2010, 2012).

Die nachfolgende von distal nach proximal fortschreitende Fusion der Ausflusstraktkissen teilt den Ausflusstrakt distal in einen rechtsseitigen (Aorta) und linksseitigen (Truncus pulmonalis) Kanal. Proximal der Überkreuzung wechseln Aorta und Truncus pulmonalis auf die jeweils andere Seite.

Die Aortensackprotrusion leitet die sechsten Kiemenbogenarterien, die dann fusionieren und sich damit vollständig vom ursprünglichen Aortensack separieren, in Richtung des linksseitigen Kanals (der sich proximal nach rechts windet) und die vierten Kiemenbogenarterien dem rechtsseitigen Kanal (der sich proximal nach links windet) zu. Letztlich führt die Fusion der Aortensack-Protrusion mit dem distalen Ende der distalen Ausflusstraktkissen zum Verschluss des Foramen aortico-pulmonale und der distal vollständigen Trennung beider Kanäle (Anderson et al., 2010, 2012) (siehe Abb.51).



**Abb.51:** Separierung des distalen Ausflusstrakts beginnend im Aortensack (Aos), bei B hat sich das Foramen aortico-pulmonale deutlich verkleinert und ist in C vollständig verschwunden, rot: Aortenbahn, violett: Truncus pulmonalis, blau: sich entwickelnde Pulmonalarterien; 3, 4, 6: dritte, vierte und sechste Kiemenbogenarterien; modifiziert nach Anderson et al., 2012 Abb.2 G-I

Kurz nach Entstehung der nicht-myokardialen Säulen wandern in die anfänglich nur von Mesenchymzellen endokardialen Ursprungs bevölkerten, sich spiralig umeinander windenden Ausflusstraktkissen auch glatte Muskel-Marker exprimierende Neuralleistenzellen bis in die proximalsten Anteile ein, während die residenten Zellen (Mesenchymzellen endokardialen Ursprungs) überwiegend dem programmierten Zelltod unterliegen (Sharma et al., 2004; Gao et al., 2010).

Die Kanäle separieren sich voneinander unter Apoptose von Mesenchymzellen an der von Zellverdichtung gekennzeichneten Fusionslinie und Ausbildung eigener vollständiger Gefäßwände aus glatter Muskulatur (Tunica media) durch die eingewanderten Zellen.

Das zwischen ihnen befindliche lockere mesenchymale Gewebe (Tunica adventitia) steht in Verbindung mit dem Gewebe, das die sich entwickelnde Trachea und den Ösophagus umgibt (Sharma et al., 2004; Sizarov et al., 2012).

Die glatte Muskulatur und die Endothelzellen der lateralen Gefäßwände entspringen überwiegend den kardiogenen Progenitoren des Zweiten Herzfelds. Mittlerweile geht man davon aus, dass die sich gegenüberliegenden Wände von Aorta und Truncus pulmonalis sowie das dazwischen befindliche Gewebe zu einem nicht geringen Teil den sich in vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen differenzierten Neuralleistenzellen entstammen (Waldo et al., 2005a; Anderson et al., 2012; Sizarov et al., 2012; Hatzistergos et al., 2015).

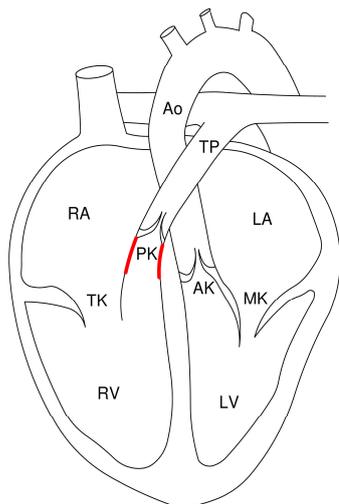
Die Differenzierung der Progenitoren in glatte Muskelzellen wird maßgeblich durch *FGF8* gesteuert, der in dieser Phase konzentrationsabhängig die *BMP*-bedingte Differenzierung in Kardiomyozyten hemmt (Liu et al., 2004; Hutson et al., 2010; Zhang et al., 2012a). Parakrine *VEGF*-Signale vom distalen Ausflusstraktmyokard steuern hingegen die Determinierung von Progenitoren auf ein endokardiales Schicksal (He et al., 2016).

Nachdem die proximalsten Anteile von septalem und parietalem Herzkissen fusioniert sind, muskularisiert das entstandene Septum zwischen den Wurzeln von Aorta und Arteria pulmonalis anschließend durch Einwanderung von Kardiomyozyten aus der Wand des proximalen Ausflusstrakts. Dieses myokardiale Septum bildet einen Teil der dorsalen Wand des subpulmonalen Infundibulums (Ausflussbereich des rechten Ventrikels, behält myokardialen Phänotyp) (Van den Hoff et al., 1999; Ya et al., 1998; reviewed in Webb et al., 2003).

Durch das starke Wachstum v.a. des rechten Ventrikels kommt es zur Verbindung zwischen dem freien Rand der fusionierten proximalen Teile der Ausflusstraktkissen mit der rechtsventrikulären Fläche des Kamms des muskulären Ventrikelseptums.

Auf diese Weise erlangt die Aorta eine zentrale Position zwischen rechtem und linkem Atrioventrikularkanal und Anschluss an den linken Ventrikel (Ya et al., 1998).

Ein Teil des myokardialen subaortalen ventrikulären Auslasses des linken Ventrikels, der aus der ursprünglichen inneren Krümmung hervorging, fibrotisiert im Gegensatz zu den Verhältnissen am Truncus pulmonalis zu einem späteren Zeitpunkt und bildet eine fibröse Kontinuität zwischen zwei Aortenklappenblättern und dem Aortenblatt der Mitralklappe, woher letztere ihren Namen bezieht. Beim Vogel hingegen behält diese Struktur ihren muskulären Charakter (Ya et al., 1998; Qayyum et al., 2001) (siehe Abb.52).



**Abb.52:** Reife Lagebeziehung der großen herznahen Arterien zueinander, beachte: die Semilunarklappen des Truncus pulmonalis (TP) sitzen leicht oberhalb der Klappenebene, rot: subpulmonales Infundibulum, Ao- Aorta, RA/LA-rechtes/linkes Atrium, RV/LV-rechter/linker Ventrikel, TK-Trikuspidalklappe, MK-Mitralklappe, modifiziert nach Lin et al., 2012a, Abb.1

### 3.4.3.3 Molekulare und physikalische Mechanismen der Remodellierung des Ausflusstrakts

Die intraperikardialen Arterienstämme erstrecken sich vom Rand der Perikardhöhle bis zur distalen Grenze des Myokards, an der sich die Semilunarklappen entwickeln (Ya et al., 1998). Aus den Überresten des myokardialen (proximalen) Ausflusstrakts gehen die subvalvulären Ausflussegmente der Ventrikel hervor.

Apoptose des subvalvulären Myokards, etwas ausgeprägter im subaortalen Bereich, scheint ein notwendiger Mechanismus für die Verkürzung und Rotation der Arterienwurzeln zur Herstellung der korrekten ventrikuloarteriellen Verbindungen zu sein (Watanabe et al., 2001; Schaefer et al., 2004).

Als wichtiger Faktor für die Remodellierungsvorgänge am Ausflusstrakt wird myokardiale Hypoxie betrachtet. *HIF- (Hypoxia-inducible factor) 2alpha*, der zum Zeitpunkt der Ausflusstraktseptierung in den Kardiomyozyten heraufreguliert ist, induziert neben pro-apoptotischen Signalen auch *VEGF* und seine Rezeptoren in den Zellen (Kubasiak et al., 2002; Sugishita et al., 2004).

*VEGF*, ein proangiogener Wachstumsfaktor, bewirkt vermutlich autokrin den Schutz der vom Hypoxie-bedingten Tod bedrohten Zellen. Andererseits kommt es auf parakrinem Weg zur Rekrutierung von vaskulogenen Progenitorzellen aus dem Zweiten Herzfeld als Antwort auf die Hypoxie (Sugishita et al., 2004).

*Retinsäure* ist ebenfalls durch den hemmenden Einfluss auf *TGFβ2* (fördert Apoptose) in die Regulation der Apoptose involviert (Kubalak et al., 2002).

Ein Großteil der residenten und eingewanderten nicht-myokardialen Zellen des proximalen Ausflusstraktseptums unterliegt ebenfalls der Apoptose und wird ab HH28 von aus umgebendem Myokard einwandernden Kardiomyozyten ersetzt (Ya et al., 1998; Van den Hoff et al., 1999). Diese *SMA (Smooth Muscle alpha Actin - Marker glatter Muskulatur)*-exprimierenden Zellen induzieren bei den verbliebenen Mesenchymzellen ebenfalls die Differenzierung in vaskuläre glatte Muskelzellen (Zhang et al., 2010). Nicht-kanonische *Wnt*-Signale (*Wnt11*; sog. planar cell polarity pathway) steuern über den Transkriptionsfaktor *Vangl2* und *Rho-GTPasen* die polarisierten Zellbewegungen der migrierenden Myokardzellen (Phillips et al., 2005). *FGF8*-Signale aus dem Myokard und *BMP2*-Signale von ab E14.5 in das proximale Septum migrierenden „epicardium-derived cells“ fördern diesen Prozess (Chen et al., 2012). Dies führt zur Bildung eines zirkulär durchgehenden Muskelbands unterhalb der Pulmonalisklappen, dem späteren sogenannten subpulmonalen Infundibulum (Überrest des Ausflusstraktmyokards). Es erhebt die Herzklappen des Truncus pulmonalis etwas über die Klappenbasis und vollzieht nach dem Rückzug der die Gefäßwurzeln noch bis in die Fetalperiode umgebenden „myokardialen Manschette“ die vollständige Trennung der Aortenwurzel vom rechten Ventrikel (Merrick et al., 2000).

Im Gegensatz dazu werden die Aortenklappen durch auf dieser Seite stärkeren Rückzug (Apoptose) des Gewebes zwischen Semilunarklappen und linkem Ventrikel an der Herzbasis eingekeilt und über Bindegewebe, das schließlich das Dach des linken Ventrikels bildet, mit dem Aortenblatt der Mitralklappe verbunden (Ya et al., 1998; Schaefer et al., 2004) (siehe Abb 54).

Die vollständig separierten Gefäße, Aorta und Truncus pulmonalis, winden sich unmissverständlich umeinander. Eine Rotationsbewegung des myokardialen Ausflusstrakts und der assoziierten Herzkissen scheint zumindest teilweise dafür verantwortlich zu sein (Anderson et al., 2003a; Bajolle et al., 2006; Anderson et al., 2012), obgleich die von anfang an bestehende spiralförmige Konfiguration der Ausflusstraktkissen nicht zu leugnen ist (Webb et al., 2003; Okamoto et al., 2010).

Form und Verlauf der Ausflusstraktkissen scheinen im wesentlichen von der Blutflussbedingten Scherspannung beeinflusst zu sein: Die sich mit Beginn des Looping spiralförmig umeinander windenden zwei Blutströme verursachen einen Scherspannungsanstieg an zwei

gegenüberliegenden Segmenten der Ausflusstraktwand (Hogers et al., 1995; Liu et al., 2007a; Bharadwaj et al., 2012; Li et al., 2012; Liu et al., 2011). In diesen Regionen werden Scherspannungs-responsive Gene, allen voran *KLF2* (*Krüppel-like factor 2*), in den Endokardzellen heraufreguliert, die in der Folge die epithelio-(endokardio-)mesenchymale Transition sowie die Expression damit assoziierter Gene wie *GATA4* und *Sox9* und somit die Endokardkissenbildung fördern (Jin et al., 2003; Chiplunkar et al., 2013). Die korrekte Positionierung des Ausflusstrakts und damit des dazugehörigen mesenchymalen Ausflusstrakt-Septums, die vermittelt durch die redundanten Rezeptoren *Frizzled1/2* via nicht-kanonischem *Wnt*-Signalweg koordiniert wird, ist hierbei unerlässlich (Yu et al., 2010).

Anatomische Studien des Looping zeigen, dass der proximale Ausflusstrakt gemeinsam mit der ventrikulären Region während des S-Looping zu einem gewissen Grad rotiert, wenngleich er auch im weiteren Verlauf durch die Retraktion in den rechten Ventrikel einer zumindest teilweisen Detorsion unterliegt (Männer, 2004).

Bestätigt wird die Rotationshypothese durch die Erkenntnis, dass zwei klonal unterscheidbare, verschieden spezifizierte Populationen myokardialer Progenitoren des Zweiten Herzfelds die jeweils kontralaterale Seite des Ausflusstrakts bevölkern, sodass sich Progenitoren des linksseitigen Zweiten Herzfelds aus dem Bereich der linken sechsten Kiemenbogenarterie an der rechts-ventralen Seite (zukünftige Pulmonalarterie) des proximalen Ausflusstrakts und Progenitoren des rechtsseitigen Zweiten Herzfelds aus der Region der rechten vierten Kiemenbogenarterie an der links-dorsalen (prospektive Aorta) Seite wiederfinden. Rotationale Migration der Progenitoren kann jedoch als potentielle Ursache für diesen Umstand nicht ausgeschlossen werden (Waldo et al., 2005b; Bajolle et al., 2008; Scherptong et al., 2012; Takahashi et al., 2012).

Scherptong et al. (2012) stellten darüberhinaus fest, dass die Rekrutierung myokardialer Progenitoren aus dem links-kaudalen pharyngealen Mesoderm unter fortgesetzter *Isl1*- und *Nkx2.5*-Expression wesentlich länger anhält (bis E12.5) als aus dem rechts-kranialen Mesoderm.

Die im Zweiten Herzfeld asymmetrisch exprimierte Transkriptions- und Wachstumsfaktoren *Tbx1*, *FGF8/10*, aber insbesondere *Pitx2C* werden als potenzielle Regulatoren des asymmetrischen Wachstums vorgeschlagen (Nowotschin et al., 2006; Ai et al., 2006; Brown et al., 2004; Yashiro et al., 2007; Scherptong et al. 2012).

*Pitx2C* induziert im Zweiten Herzfeld die linksseitige *Nkx2.5*-Expression bzw. erhält sie länger aufrecht im Vergleich zur rechten Seite. Dies zieht eine verlängerte Proliferationsphase der Vorläufer des subpulmonalen im Gegensatz zum subaortalen Myokard bzw. dynamische morphologische Veränderungen des Ausflusstrakts in Form einer Rotation um 180° nach sich (Yashiro et al., 2007; Bajolle et al., 2008; Scherptong et al., 2012).

In wie weit der zeitlich verzögerte epikardiale Überzug des myokardialen Ausflusstrakts (ab E9.5 auf der Aortenseite und erst ab E12.5 auf der pulmonalen Seite) und darauffolgender Verlust der *Nkx2.5*-Expression in Zusammenhang stehen, wurde nicht untersucht (Scherptong et al., 2012).

Daneben scheinen *VEGF*-Signale die korrekte Positionierung der subpulmonalen Precursor zu medieren (Van den Akker et al., 2007; Scherptong et al., 2012).

Auf diesen Erkenntnissen basiert das „pulmonary push“-Konzept von Scherptong et al. (2012). Es besagt, dass die verstärkte Addition (sub-)pulmonalen Myokards aus dem Bereich der linksseitigen sechsten Kiemenbogenarterie die zukünftige Pulmonalarterienöffnung in eine Position rechts kranial der zentral und kaudal davon gelegenen zukünftigen Aortenöffnung drückt.

Zusammenfassend gesagt ist ein Zusammenspiel aus Hypoxie-bedingter Apoptose, asymmetrischer Zellproliferation im Zweiten Herzfeld und damit einhergehender Rotation und veränderter hämodynamischer Kraftwirkung für die korrekte Konfiguration des Ausflusstrakts und der später vollständig voneinander separierten großen Arterienstämme des Herzens verantwortlich.

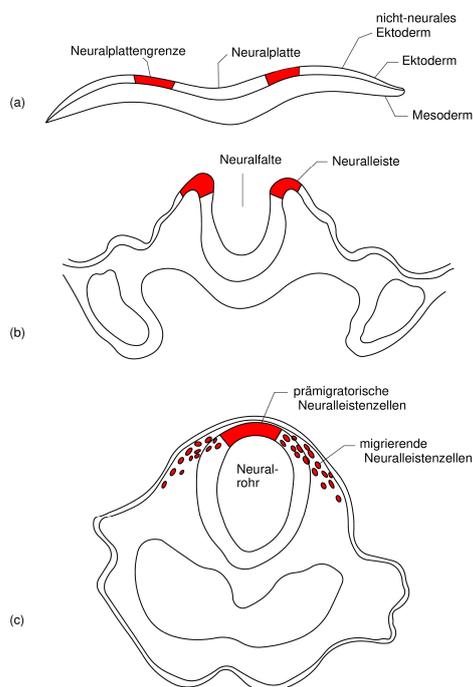
### 3.4.4 Kardiale Neuralleistenzellen und die Ausflusstraktseptierung

#### 3.4.4.1 Herkunft und Induktion kardialer Neuralleistenzellen

Neuralleistenzellen bilden eine multipotente Zellpopulation, die in der Lage ist, sich in ektodermale (autonome Neurone, Glia, Pigmentzellen) und mesodermale (glatte Muskulatur, Chondrozyten) Zelltypen zu differenzieren (Vincentz et al., 2013).

Die für die Kardiogenese bedeutsame Subpopulation sogenannter „kardialer Neuralleistenzellen“ entspringt dem kranialen Bereich des dorsalen Neuralrohrs (Kirby et al., 1983).

Die Induktion der Neuralleistenzellen erfolgt während der Gastrulation am Übergang zwischen Neuroektoderm und nicht-neuralem Ektoderm durch eine bei Vogelartigen recht gut erforschte Kombination von *FGF*-, *BMP* und *Wnt*-Signalen ektodermalen Ursprungs (siehe Abb. 53).



**Abb.53:** Herkunft kardialer Neuralleistenzellen vor, während und nach der Faltung der Neuralplatte; modifiziert nach Stuhlmiller et al., 2012

In einer ersten Phase reguliert *FGF(4/8)* die Expression verschiedener *Wnt*-Liganden herauf und hemmt *BMP(4/2)* (Wilson et al., 2000; Stuhlmiller et al., 2012).

Vom Hensenknoten bzw. der Chorda dorsalis sezernierte *BMP*-Antagonisten, wie *Chordin*, *Noggin* und *Calreticulin*, supprimieren ebenfalls die Expression von *BMP*. Dies ist notwendig für die Expansion der Neuralplatte und die Etablierung ihrer korrekten Grenzen (Bachiller et al., 2000; Patthey et al., 2009; De Almeida et al., 2017). Kanonische *Wnt*-Signale sind notwendig für die Induktion der Neuralleistenzellen zu diesem Zeitpunkt (Steventon et al., 2009).

In der zweiten Phase der Induktion während der Neurulation reaktivieren kanonische *Wnt*-Signale die *BMP4*-Expression, welche nun für die Aufrechterhaltung der Neuralleistenzell-Marker-Expression unerlässlich ist (Selleck et al., 1998; Patthey et al., 2009).

Eindeutige induktive Funktion von *FGF*, *Wnt* und *BMP* wurden bei der Maus bislang nicht festgestellt. *FGF4/8*-Knockout führt bereits kurz vor der Gastrulation zum Absterben der Embryonen (Feldmann et al., 1995; Sun et al., 1999).

Die Regulation der *BMP4*-Aktivität durch Antagonisten ist auch hier erforderlich zur Beschränkung der Neuralleistenzell-Population (Anderson et al., 2006b). *BMP2* und *Wnt1/3a* besitzen ebenfalls keine induktive Funktion bei der Maus, sind aber notwendig für die Migration und die weitere Entwicklung der Neuralleistenzellen (Ikeya et al., 1997; Brault et al., 2001; Stottman et al., 2004; Wang et al., 2006).

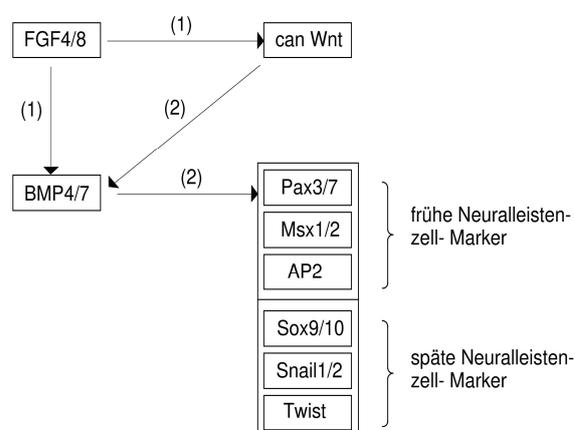
Grundsätzlich vermutet man die Etablierung eines *BMP*-Gradienten als Ursache für die Diversifizierung der Zellschicksale am Übergang zwischen Neuralplatte und nicht-neuralem Ektoderm. Ein bestimmtes *BMP*-Level in dieser Region könnte die Neuralleistenzellen induzieren bzw. diese Region permissiv machen für induktive Signale (Anderson et al., 2006b).

Ob der induktive Signalaustausch grundsätzlich lediglich zwischen den beiden ektodermalen Geweben stattfindet, oder das darunterliegende Mesoderm mit einbezogen ist, bleibt bislang ungeklärt. Das Mesoderm scheint allerdings zumindest beim Huhn entbehrlich für die Neuralleistenzell-Induktion zu sein (Selleck et al., 1995).

Beim Huhn wurde der Transkriptionsfaktor *Pax* (*Paired box*)7 und bei der Maus Transkriptionsfaktor *AP* (*Activating protein*) 2 als früheste Regulatoren der Neuralleistenzell-Spezifikation identifiziert (Mitchell et al., 1991; Basch et al., 2006).

In der Folge werden Marker der Neuralplattengrenze wie *Pax3/7*, *Msx1/2*, *AP2* und kurz darauf spezifische Neuralleistenzellmarker wie *Sox9/10*, *Snail1/2*, *Twist* u.a. exprimiert (Khudyakov und Bronner-Fraser, 2009; Inoue et al., 2004/2007; Mitchell et al., 1991; reviewed in Lee et al., 2016). Die Transkriptionsfaktoren *Sox9* und *Snail* fördern in Zusammenspiel mit dem Transkriptionsfaktor *FoxD3* die epithelio-mesenchymale Transition der Zellen als Voraussetzung für die Migration. *FoxD3* reguliert auch die Expression für die Migration bedeutungsvoller Zelladhäsionsmoleküle (Cheung et al., 2005).

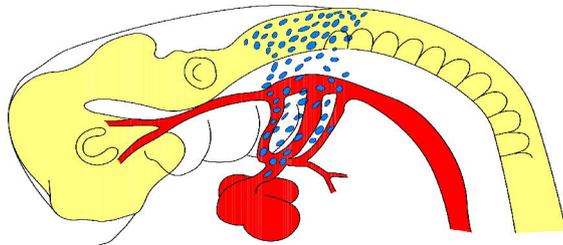
Der Transkriptionsfaktor *Pbx1* (*Pre-B cell leukemia transcription factor1*) aktiviert zusammen mit seinen Co-Faktoren *Hox* und *Meis* den Transkriptionsfaktor *Pax3* in prä-migratorischen Neuralleistenzellen (E7.5) bei der Maus (Chang et al., 2008; Stankunas et al., 2008). *Pax3*-Aktivität unterdrückt die *Msx2*-Expression und spezifiziert in einer frühen Phase Neuralleistenzellen für die Ausflusstraktseptierung, während seine Wirkung später der Feinregulation ihrer migratorischen Fähigkeiten dient (Epstein et al., 2000; Kwang et al., 2002; Olaopa et al., 2011) (siehe Abb.54).



**Abb.54:** Transkriptionale Regulation der Induktion von kardialen Neuralleistenzellen, FGF4/8: Fibroblast Growth Factor4/8, canWnt: kanonisches Wnt-Signal, BMP4/7: Bone Morphogenetic Protein4/7, Pax3/7: Paired-box3/7, Msx1/2: Muscle segment homeobox1/2, AP2: Activating protein2, Sox9/10: Sry-related HMG box9/10, Snail1/2: Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie, Twist: Twist-related protein, ausführliche Erklärung im Text; eigene Darstellung

### 3.4.4.2 Migration der Neuralleistenzellen und ihre Regulation

Bei der Maus delaminieren die Neuralleistenzellen ab E9.5 via Transition in mesenchymale Zellen in einer rostro-kaudalen Welle vom Neuralrohr und migrieren über die Kiemenbögen, deren Entstehung und Remodellierung sie unterstützen, über die dorsale Aortensackwand und die distalen Ausflusstraktkissen am E10 in den Ausflusstrakt ein (Jiang et al., 2000; Waldo et al., 1996; Gitler et al., 2002) (siehe Abb.55).



**Abb.55:** Migrationsroute der Neuralleistenzellen, gelb: zukünftiges Zentralnervensystem (Neuralrohr), rot: entstehendes kardiovaskuläres System, blau: wandernde kardiogene Neuralleistenzellen; modifiziert nach Keyte et al., 2012, Abb.1

Kurz nach der Delamination exprimieren sie den Mesenchym-Marker *Twist1*, der die Migration zum Ausflusstrakt reguliert und über Hemmung der pro-neuralen Transkriptionsfaktoren *Sox10* und *Phox (Paired homeobox) 2b* die Differenzierung in neuronale Zellen im Ausflusstrakt verhindert (Vincentz et al., 2013).

Interaktionen zwischen dem Zweiten Herzfeld und den hindurch migrierenden Neuralleistenzellen sind essentiell für die Entwicklung beider Zellpopulationen.

*FGF8* aus pharyngealem Meso-, Ekto- und Entoderm ist ein chemotaktischer Stimulus für Neuralleistenzellen (High et al., 2007, 2009; Sato et al., 2011, 2012).

Andersherum scheinen Neuralleistenzellen die *FGF8*-Signale in der pharyngealen Region zu beeinflussen, da bei Neuralleistenzellablation *FGF8* heraufreguliert wird einhergehend mit erhöhter Proliferationsrate, aber mangelnder Elongation und Looping des myokardialen Ausflusstrakts (Yelbuz et al., 2002; Waldo et al., 2005a; Hutson et al., 2006; Park et al., 2008).

Über *PDGF*-Rezeptoren auf den Neuralleistenzellen medierte *PDGF*-Signale sind essentiell für die korrekte Migration (Richarte et al., 2007).

Das vom Kiemenbogenendothel sezernierte Signalmolekül/Wachstumsfaktor *Endothelin-1 (ET1)* wirkt durch die Aktivierung der *ETA*-Rezeptoren auf der Oberfläche wandernder Neuralleistenzellen modulierend auf die Kiemenbogen- und Ausflusstraktentwicklung (Yanagisawa et al., 1998a).

Beim Huhn im Bereich des dorsalen Neuralrohrs und entlang der Wanderoute exprimierte membrangebundene Proteinliganden *Sema6A* und *Sema6B (Semaphorine)* bewirken bei Bindung an auf der Oberfläche der migrierenden Neuralleistenzellen befindliche *PlexinA2*-Rezeptoren eine Abstoßung bzw. Weiterleitung dieser Zellen. Im Ausflusstraktmyokard hingegen leitet die Expression von *Sema3C* über Bindung an *PlexinD1* und *Neuropilin1* auf den Neuralleistenzellen diese zum Ausflusstrakt (Toyofuku et al., 2008).

Bei Maus und Mensch scheinen ähnliche, bislang aber noch weniger gut untersuchte Mechanismen zu existieren (Brown et al., 2001; Feiner et al., 2001; Gitler et al., 2004). Bei diesen Spezies bilden *Sema3C* und *PlexinA2* bzw. *Neuropilin1* (Maus) einen chemoattraktiven Komplex. *GATA6* ist für die Aktivierung der Expression von *Sema3C* im Ausflusstrakt und im Kiemenbogenendothel und von *PlexinA2* in den Neuralleistenzellen unerlässlich (Lepore et al., 2006; Kodo et al., 2009; Plein et al., 2015).

Ein komplexes Zusammenspiel repulsiver und attraktiver Signale, die vermutlich einen Einfluss auf die Kontrolle von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion oder die Mikrotubulodynamik ausüben, navigiert also die Neuralleistenzellen zu ihrem Zielort (Toyofuku et al., 2008).

#### 3.4.4.3 Beitrag zur Ausflusstraktseparierung

Kirby et al. (1983) erkannten als erste eher zufällig die fundamentale Bedeutung der kardialen Neuralleistenzellen für die Septierung des Ausflusstrakts.

Während ein Teil der Neuralleistenzellen im Bereich der Kiemenbögen verbleibt, um sich proliferierend und zur Tunica media der Kiemenbogenarterien differenzierend um das Kiemenbogenendothel zu legen, wandert der andere Teil der Population am Kiemenbogen- und Aortensackendothel entlang bis zum arteriellen Herzpol (Kirby et al., 1983; Waldo et al., 1996).

Im distalen Ausflusstrakt treten die bereits *SMA* (*Smooth muscle alpha actin*)- exprimierenden Neuralleistenzellen bei der Maus ab E9.5 erstmals in Gestalt der Aortensackprotrusion in Erscheinung. Kurz darauf infiltrieren weitere Neuralleistenzellen die Wände des Ausflusstrakts im Bereich der noch von Myokard umgebenen (parietales und septales) Herzkissen und migrieren weiter nach proximal.

Innerhalb der Herzkissen wandern sie in die Fusionslinie und differenzieren sich in glatte Muskulaturzellen und Endothelzellen der neu entstehenden gegenüberliegenden separaten Gefäßwände von Aorta und Truncus pulmonalis (Sizarov et al., 2012; Anderson et al., 2012; Hatzistergos et al., 2015). Neuralleistenzellen sind unerlässlich für die korrekte Entwicklung der Ausflusstraktkissen, die Separierung des Ausflusstrakts und die Remodellierung der Semilunar-klappen (Phillips et al., 2013; Ma et al., 2016).

Gefördert wird die Differenzierung der kardialen Neuralleistenzellen u.a. durch *Notch*-, *FGF8*-, *BMP4*- und *ETS1*. Der *Notch*-Signalweg fördert die zellautonome Differenzierung der Neuralleistenzellen (High et al., 2007). *FGF8*-Signale im Ausflusstrakt fördern die *BMP4*-Expression. *BMP4* verstärkt sowohl die Invasion der Neuralleistenzellen in die Herzkissen als auch deren Differenzierung (Zhang et al., 2010). *ETS1*, ein proto-onkogener Transkriptionsfaktor, der invasives Verhalten von u.a. vaskulären glatten Muskulaturzellen steuert, wird von den durch die Ausflusstraktkissen migrierenden Neuralleistenzellen exprimiert. Er fördert die Expression von *GATA6* und *Sox4* und hemmt die Expression von *Sox9* und *Aggrecan* (chondrogener Weg), wodurch er einen maßgeblichen Einfluss auf Migration und Differenzierung ausübt (Gao et al., 2010).

Die Migration der Neuralleistenzellen, von der man früher annahm, dass sie oberhalb der entstehenden Semilunarklappen abgeschlossen sei, vollzieht sich neueren Erkenntnissen nach weit proximal, wo Abkömmlinge dieser Zellen sogar im membranösen Teil des Ventrikelseptums und den Mitralklappen zu finden sind. Ihr kardiomyogenes Potential wird im Zeitfenster ihrer Einwanderung ins Herz gehemmt durch veränderte *BMP*- und *Wnt/β-Catenin*-Aktivität. Dennoch stellen sie auch eine (verschwindend) geringe Anzahl an atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten (Gurjarpadhye et al., 2007; Gao et al., 2010; Ma et al., 2016; Hatzistergos et al., 2015).

### 3.5. Die Morphogenese des venösen Herzpols

#### 3.5.1 Etablierte Grundlagen und widerlegte Annahmen

Der Sinus venosus umschreibt das embryonale Einmündungsgebiet der intraperikardialen myokardial umhüllten Anteile der systemischen venösen Zuflüsse (rechtes und linkes Sinushorn) in das gemeinsame Atrium.

In der fetalen Periode wird diese Struktur mit einem Großteil des rechten Sinushorns in die Wand des rechten Vorhofs inkorporiert (Rüsse und Sinowatz, 1998 und 2015; McGready et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010). Aus dem Überrest des rechten Sinushorns entsteht die rechte Vena cava cranialis/superior. Das Myokard des linken Sinushorns persistiert bei der Maus als Myokard, das die linke Vena cava cranialis/superior umgibt, wohingegen es beim Menschen zur Wand des Koronarsinus wird (Mommersteeg et al., 2010; Sizarov et al., 2010). Die drei Paare konsekutiv entstehender, anfänglich symmetrischer venöser Zuflüsse, (1) die Vv. vitellinae (Synonym: Vv. omphalomesentericae), (2) die Vv. umbilicales und (3) die Vv. cardinales communes unterliegen im weiteren Verlauf komplexen Remodellierungsvorgängen, die schließlich zu einer Dominanz der gemeinsamen Kardinalvenen, v.a. der rechten, mit deren Verlagerung ins rechte Atrium führen (Sinowatz und Rüsse, 1998 und 2015; McGready et al., 2006).

Die Vitellinvenen münden streng genommen nicht in den Sinus venosus, wie es in Lehrbüchern dargestellt wird, da sich das Sinus venosus-Myokard erst nach dem Looping und der Etablierung der gemeinsamen Kardinalvenen als dominante systemische venöse Zuflüsse zum Herzschlauch bildet (Rüsse und Sinowatz, 1998 und 2015; McGready et al., 2006; Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010).

Inkorrekt ist auch die althergebrachte Anschauung, die Vena pulmonalis wüchse aus dem linken Atrium aus (Neill, 1956; Jones et al., 1994; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010). Wenngleich ihre myokardiale Umhüllung Eigenschaften des atrialen Myokards teilt, ist sie eine „de novo“ im dorsalen Mesokard entstehende Struktur (Anderson et al., 2006a).

Die initial singuläre Vena pulmonalis ist noch nicht einmal eine originär linksseitige Struktur, sondern ursprünglich in der Mitte zwischen rechtem und linkem Atrium bzw. bilateral angelegt (Wessels et al., 2000; Soufan et al., 2004; Männer und Merkel, 2007; Sizarov et al., 2010).

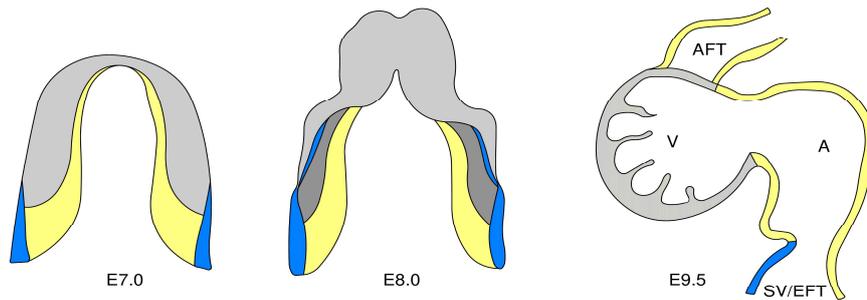
Die Verwandtschaft zwischen den Vv. cavae als systemischen venösen Zuflüssen und den Vv. pulmonales wird auf der Grundlage genetischer, morphogenetischer und klonaler Untersuchungen kontrovers diskutiert.

#### 3.5.2 Entstehung der systemischen venösen Zuflüsse zum Herzen

##### 3.5.2.1 Ursprung und Remodellierung der Sinus venosus-Region

Die Progenitoren des Sinus venosus-Myokards entstammen, wie auch die des Proepikards, dem kaudolateralen Rand des kardiogenen Mesoderms in enger Nachbarschaft zum Septum transversum (Viragh und Challice, 1981; Lescroart et al., 2012).

Nach der Faltung des Embryos befindet sich diese zunächst noch mesenchymale Zellpopulation beidseitig ventrolateral am Einflusstiel des Herzschlauchs (Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010) (siehe Abb.56).



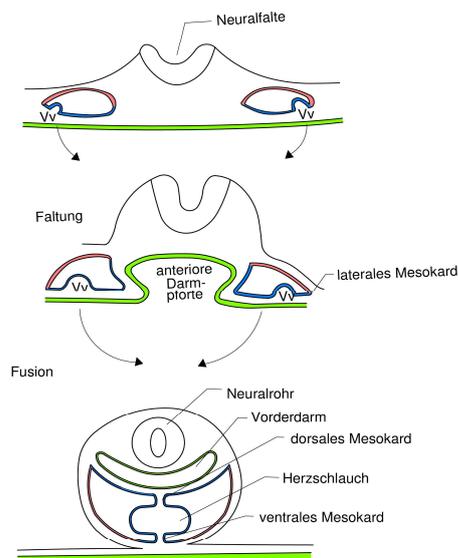
**Abb.56:** Lokalisation der Progenitorzellen des Sinus venosus (blau) in den bilateralen Herzfeldern (E7.5), kurz nach Beginn der Herzschlauchbildung (E8.0) und nach Etablierung des geraden Herzschlauchs (E9.5), AFT: Ausflusstrakt, V: Ventrikel, A: Atrium, SV/EFT: zukünftiger Sinus venosus/Einflusstrakt; modifiziert nach Mommersteeg et al., 2010, Abb.6

Als erste venöse Zuflüsse in Kontinuität zum entstehenden Herzschlauch bilden sich die paarigen Vitellinvenen im noch scheibenförmigen Embryo (De Jong et al., 1990; De Ruiter et al., 1993; Moreno-Rodriguez et al., 2006). Die von Endothel ausgekleideten und von Mesothel (noch weitgehend undifferenziertes Epithel mesodermalen Ursprungs) umgebenen Gefäße entstehen an den lateralen Enden des viszeralen Mesoderms am Übergang zum Somatomesoderm (siehe Abb.59).

Diese Gefäße gehen nach kaudal in die im extraembryonalen Mesoderm entstehenden Blutinseln über, die den Dottersack umgeben.

Nach der Ventralfaltung des Embryos und daraus folgender Fusion des kardiogenen Mesoderms zum Herzschlauch drainieren sie zunächst bilateral symmetrisch in das primitive Atrium. Der primitive Herzschlauch ist demzufolge nicht mehr und nicht weniger als die kraniale fusionierte Verlängerung der Vitellinvenen (Van den Berg und Moorman, 2011).

Das ventrale Mesokard geht im Bereich der anterioren Darm- und Darm-Öffnung in die Verbindung zwischen viszeralem und somatischem Mesoderm herstellende laterale Mesokard über (siehe Abb.57).



**Abb.57:** Entstehung der Venae vitellinae und des mit ihnen in Kontinuität stehenden Herzschlauchs, rot: somatisches Mesoderm, blau: viszerales Mesoderm, grün: Entoderm, Vv- Venae vitellinae; modifiziert nach Van den Berg und Moorman, 2011, Abb. 1

Im somatischen Mesoderm entstehen bei HH12 im Hühnerembryo rechts- und linksseitig im Bereich der vorderen Darm- und Darm-Öffnung die der venösen Drainage des Embryos selbst dienenden gemeinsamen Kardinalvenen. Sie nehmen das Blut der jeweils ipsilateralen kranialen und

kaudalen Kardinalvenen sowie der ipsilateralen Umbilikalvenen (drainieren die Allantois beim Huhn bzw. die Plazenta beim Säuger) auf und leiten es der ipsilateralen Seite der Einflusskomponente des Herzens zu (Van den Berg und Moorman, 2011).

Die von noch locker arrangiertem Mesenchym umgebenen gemeinsamen Kardinalvenen vergrößern sich im weiteren Verlauf, wohingegen die Vitellinvenen an Prominenz verlieren.

Ab HH21 bzw. E10.5 verlagern sich die Eintrittsöffnungen der systemischen venösen Zuflüsse unter Rotation während des fortgesetzten, linksseitig dominierenden Wachstums der Atrien und der Entstehung des atrialen Septums auf die rechtsatriale Seite. Daraus resultiert die Verlängerung der linken Vena cardinalis communis (Christoffels et al., 2006; reviewed in Anderson et al., 2006a; Van den Berg und Moorman, 2011).

Das kraniale Segment der rechten V. vitellina persistiert als Teil der V. cava caudalis. Die herznahen Segmente der Vv. umbilicales atrophieren nach und nach. Ab E9.5/HH25 beginnt sich das Kardinalvenenmesenchym in primäres Myokard zu differenzieren (Christoffels et al., 2006; Männer und Merkel, 2007; Mommersteeg et al., 2010; Van den Berg und Moorman, 2011).

Die nun vollständig von Myokard umhüllten intraperikardialen Anteile der gemeinsamen Kardinalvenen, die sogenannten Sinushörner, und ihr gemeinsames Einmündungsgebiet in den rechten Vorhof, das auch den Sinusknoten und einen Teil der Venenklappen am Foramen sinuatriale umfasst, bezeichnet man als Sinus venosus.

Diese embryonale Struktur wird in der fetalen Periode mit dem Großteil des rechten Sinushorns in die Wand des rechten Atriums inkorporiert. Aus dem Überrest des rechten Sinushorns (ursprünglich rechte gemeinsame Kardinalvene) differenziert sich die myokardiale Wand der rechten Vena cava cranialis. Das Myokard des linken Sinushorns persistiert bei Huhn und Maus als Myokard, das die linke Vena cava cranialis umgibt, beim Menschen als Sinus coronarius-Myokard (Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010; Sizarov et al., 2010; Van den Berg und Moorman, 2011).

### 3.5.2.2 Transkriptionale Regulation im Sinus venosus

Die Progenitoren des Sinus venosus-Myokards unterscheiden sich von den übrigen Vorläuferzellen des Ersten und Zweiten Herzfelds durch den frühen Verlust der *Isl1*- und *Nkx2.5*-Expression (ab E7.5) und durch die ab E8.25 einsetzende Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx18*, weshalb sie von einigen Autoren als drittes Herzfeld eingeordnet werden. Sie befinden sich im Herzschlauchstadium in der kaudoventralen Perikardhöhlenwand ventral des venösen Herzpols (Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010; Sizarov et al., 2010) (siehe Abb.57).

Die Interaktion zwischen promyokardialen *BMP*- und anti-myokardialen *FGF*-Signalen ist verantwortlich für die Separierung proepikardialer und myokardialer Zellen innerhalb dieser Population am venösen Herzpol (Van Wijk et al., 2009) (siehe Seite 57, Abb.28).

*Tbx18* wird durch Signale aus der benachbarten Leberknospe induziert und ist unerlässlich für die korrekte Bildung und myokardiale Differenzierung des Sinus venosus (Christoffels et al., 2006; Ishii et al., 2007).

Die kaudoventrale Domäne des Zweiten Herzfelds, aus dem Sinus venosus-Myokard und Epikard hervorgehen, exprimiert auch das Transmembran-Glykoprotein *Podoplanin*, das via Herunterregulation des Adhäsionsproteins *E-Cadherin* und Heraufregulierung von *RhoA*, eines in die Regulation des Aktinzytoskeletts eingebundenen Proteins, die epithelio-mesenchymale Transition und die Migration fördert (Groot et al., 2007; Mahtab et al., 2009). Korrekte *Podoplanin*-Expression ist somit essentiell für die Entwicklung von sowohl Sinus venosus-Myokard als auch Epikard und Sinuatrialknoten (Mahtab et al., 2008; Douglas et al., 2009).

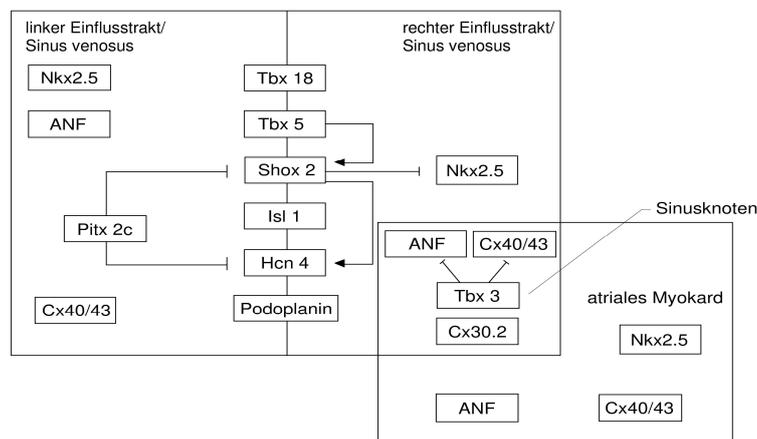
Der linksseitig exprimierte Transkriptionsfaktor *Pitx2* ist von entscheidender Bedeutung für die asymmetrische Morphogenese der sinuatrialen Region (Franco et al., 2000; Ammirabile et al., 2012).

In früheren Stadien (Huhn HH15-28) besitzt die gesamte, durch *Podoplanin*-, *RhoA* und *Hcn4* (*hyperpolarization-activated channel*, Ionenkanal)-Expression gekennzeichnete prospektive Sinus venosus-Region Schrittmacher-Potenzial (Vicente-Steijn et al., 2010).

*Pitx2* reguliert das für die Generierung von Schrittmacherpotenzialen verantwortliche *Hcn4* auf der linken Seite dieser Region herunter und begründet somit die Schrittmacher-Dominanz der rechten Seite des Einflusstrakts (Ammirabile et al., 2012).

Das durch *Tbx3*-Expression gekennzeichnete Myokard des Sinusknotens, dessen Progenitoren anfänglich (E8.25) noch beidseitig an der Grenze zwischen Zweitem Herzfeld und den Sinus venosus-Vorläufern residieren, entwickelt sich in einer *Tbx18*- sowie *Isl1*-positiven Zone innerhalb des sich differenzierenden Sinus venosus-Myokards an der rechts-lateralen Seite des Einflusstrakts zwischen der rechten Vena cava cranialis und dem rechten Atrium (Mommersteeg et al., 2010).

*Pitx2* verhindert Expansion und Differenzierung seines linksseitigen Pendantes in der linken Sinus venosus-Region über eine Suppression von *Shox2* (*short stature homeobox gene*, Homöoboxgen) sowie möglicherweise auch durch Modulation von *Isl1* und *Tbx18* (Espinoza-Lewis et al., 2009, 2011; Ammirabile et al., 2012) (siehe Abb.58).



**Abb.58:** Regulatorisches Netzwerk im embryonalen Einflusstrakt, Nkx2.5: NK-homeodomain2.5, ANF: Atrialer Natriuretischer Faktor, Cx40/43/30.2: Connexine40/43/30.2, Tbx18/5/3: T-box18/5/3, Pitx2C: pituitary homeobox2C, Shox2: Short stature homeobox2, Isl1: Islet-1, Hcn4: Hyperpolarization-activated nucleotide-gated channel4; eigene Darstellung

*Pitx2* fördert darüberhinaus die für die Rechtsverlagerung der systemischen venösen Zuflüsse notwendige Expansion des linken Sinushorn- bzw. linken Kavalvenen-Myokards durch verstärkte Proliferation der Vorläuferzellen im linken Herzfeld. *Pitx2*-Defizienz führt zu rechtsatrialem Isomerismus, bilateraler Ausbildung von Sinusknoten, bilateral symmetrischem Eintritt der systemischen Venen in die Atrien und Einmündung der Pulmonalvene in der Mittellinie des *Nkx2.5*-positiven atrialen Myokards (Mommersteeg et al., 2007a, b; Ammirabile et al., 2012).

Ab etwa E14.5 nehmen Sinushorn- und Kavalvenenmyokard abgesehen vom Sinuatrialknoten zunehmend Arbeitsmyokardcharakter, gekennzeichnet durch *Nkx2.5*- und *Cx40*-Expression, an (Mommersteeg et al., 2007b).

### 3.5.3 Entwicklung der Vena pulmonalis

#### 3.5.3.1 Entstehung des Pulmonalvenenendothels

Die Vena pulmonalis entsteht als nichtatriale, morphologisch und anatomisch „neue“ Struktur im dorsalen Mesokard, das im Bereich des primitiven gemeinsamen Atriums persistiert (reviewed in Anderson et al., 2006).

Das Pulmonalvenenendothel separiert sich ab etwa HH20/E9 innerhalb des *Isl1*- und *Nkx2.5*-positiven dorsalen Mesokards aus einem venösen Plexus (sog. dorsaler mesokardialer Plexus), dessen mesenchymale Vorläufer aus dem subpharyngealem Splachnemesoderm (Zweites Herzfeld) eingewandert sind und der auch Verbindungen zu den systemischen venösen Zuflüssen aufweist (Mommersteeg et al., 2010; Van den Berg und Moorman, 2011).

Der als „mittelpharyngealer endothelialer Strang“ bezeichnete Vorläufer des Vena pulmonalis-Endothels kanalisiert und nimmt nach kaudal zum dorsalen Dach des gemeinsamen Atriums und nach kranial zum entstehenden pulmonalen Venenplexus Verbindung auf (Van den Berg und Moorman, 2011; Degenhardt et al., 2013).

Am Übergang zwischen viszeralem Mesoderm zum venösen Herzpol vom Mesokard sezernierte *Semaphorine 3D* üben über *Neuropilin-1*-Rezeptoren auf der Oberfläche der Endothelzellen des mittelpharyngealen endothelialen Strangs repulsive Signale auf die Endothelzellen aus. Dadurch kommt es zur Etablierung vaskulärer und avaskulärer Zonen, deren Muster die korrekte Anastomosierung von Venenabschnitten, also Pulmonalvenenstrang mit dem Atrium, bzw. Separierung, sprich Pulmonalvenenstrang von den systemische Venen, gewährleistet. *Semaphorin 3D*-Defizienz resultiert in abnormalen Verbindungen der Pulmonalvene mit den systemischen Venen oder dem rechten Vorhof (Degenhardt et al., 2013). Für die korrekte Plexusbildung in Richtung Lunge sind *Sonic hedgehog (Shh)*-Signale vom kranialen Vorderdarmentoderm essentiell (Peng et al., 2013).

#### 3.5.3.2 Genese und Regulation des Myokards der Vena pulmonalis

Das Myokard der Vena pulmonalis entsteht später als das Sinus venosus-Myokard ab etwa E11.5 aus einer Population mesenchymaler Zellen, die den anfänglich endothelialen Pulmonalvenenstrang am Übergang zum Atrium umgeben und nicht, wie früher vermutet, durch progressive Differenzierung der den Strang in ganzer Länge umgebenden Mesenchymzellen (Van den Hoff et al., 2004; Mommersteeg et al., 2007a). Seine Vorläufer entstammen einer „kardiopulmonalen“ Vorläuferpopulation im Zweiten Herzfeld, die nicht nur Kardiomyozyten für Einflusstrakt und Vena pulmonalis bereitstellt, sondern u.a. auch für glatte Muskelzellen der Lungengefäße und der Atemwege (Peng et al., 2013).

Die unmittelbaren Progenitoren des Pulmonalvenenmyokards exprimieren sowohl *Nkx2.5* und *Pitx2* als auch *Cx40* (*Connexin 40*: Gap junction-Protein, Marker atrialen und ventrikulären Arbeitsmyokards), nicht aber *ANF* (*Atrialer Natriuretischer Faktor*, Vorkammer-Marker), stehen also genotypisch dem atrialen Myokard recht nahe (Mommersteeg et al., 2007a).

Nach einer schnellen initialen Proliferationsphase an der Venenbasis breiten sich die Vena pulmonalis-Kardiomyozyten bis E14.5 durch fortgesetzte Proliferation und Migration unter progressiver Differenzierung über den Stamm der Pulmonalvene bis in die kleinsten venösen Abzweigungen in der sich entwickelnden Lunge aus (Mommersteeg et al., 2007a; Lescroart et al., 2012).

*Pitx2* ist von entscheidender Bedeutung für die korrekte Proliferation und Differenzierung des Pulmonalvenenmyokards (Mommersteeg et al., 2007a).

Neben dem Sinus venosus-Myokard exprimieren auch Pulmonalvenenmyokard, dorsales Mesokard, Primäres Atriales Septum und die Dorsale Mesenchymale Protrusion (DMP) den

Marker der kaudalen Region des Zweiten Herzfelds *Podoplanin*, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt als der Sinus venosus. *Podoplanin* ist ebenfalls unerlässlich für die korrekte Myokardialisierung der Vena pulmonalis (Mahtab et al., 2009).

### 3.5.3.3 Lateralität der Vena pulmonalis

Nachdem zu Beginn ihrer Entstehung die Anlage ihrer Mündung (sogenannte Pulmonalisgrube) in den noch weitgehend symmetrischen Einflusstrakt in der Mittellinie lokalisiert ist, wird der Zugang der Pulmonalvene im Verlauf der Rechtsverlagerung des Sinus venosus und der Etablierung des Septum interatriale in das linke Atrium inkorporiert (Van den Berg und Moorman, 2011).

Der Wachstumsfaktor *Platelet-derived Growth Factor A (PDGFA)* und sein Rezeptor scheinen eine wesentliche Rolle bei diesem Vorgang zu spielen. *PDGFA* wird während dieser kritischen Phase im Bereich der zukünftigen Pulmonalvenenmündung linksatrial exprimiert und sein Rezeptor in der Dorsalen Mesenchymalen Protrusion, die dem dorsalen Mesokard entstammt und durch die Fusion mit den übrigen septalen Bestandteilen zur Trennung der Pulmonalvene von den systemischen Venen beiträgt (Mommersteeg et al., 2006; Bleyl et al., 2010). Lokales Knockout von *PDGFA* oder seinem Rezeptor resultiert in mangelhafter Linksverlagerung der Pulmonalvene und ihrer Einmündung in den Sinus venosus (Bleyl et al., 2010).

Nach Erkenntnissen von Männer und Merkel (2007) ist die Pulmonalisgrube im Stadium HH16 beim Huhn bilateral paarig im embryonalen Einflusstrakt (cave: nicht zu verwechseln mit dem Sinus venosus!) angelegt. Zwischen HH16 und HH20 verschwindet der rechte Anteil und der linke vertieft sich.

Bei Maus und Mensch zeigt sich die Pulmonalisgrube aufgrund ihrer geringen Ausdehnung eher als solitäre Struktur in der Mittellinie (Webb et al., 1998 Wessels et al., 2000), obgleich Soufan et al. (2004) zumindest im Schnittbild die bilaterale Natur des Pulmonalvenenprimordiums aufdeckten.

Dieser überraschende, aber bislang kaum gewürdigte Sachverhalt könnte die morphologische Grundlage für die abnormale Entwicklung einer direkten Verbindung der Vena pulmonalis zum rechten Atrium bilden (Männer und Merkel, 2007).

### 3.5.4 Die morphogenetisch-topographische und genetische Beziehung zwischen Vena pulmonalis und Sinus venosus

Während einige Forscher für einen Urprung der Pulmonalisgrube, der Anlage der Mündung der Pulmonalvene, im Sinus venosus argumentieren und damit auch eine gewisse klonale Beziehung implementieren (DeRuiter et al., 1995; Tasaka et al., 1996; Blom et al., 2001; Jongbloed et al., 2008), sehen ihn andere Untersucher vollkommen separiert von den systemischen venösen Zuflüssen im primitiven gemeinsamen Atrium (Webb et al., 1998, 2000, 2001; Soufan et al., 2004; Wessels et al., 2000; Anderson et al., 2006a; Van den Berg und Moorman, 2011).

Abweichend davon schlägt das Konzept von Männer und Merkel (2007) unter Einbeziehung eines zusätzlichen Kompartiments faktisch eine Brücke zwischen den konkurrierenden Ansichten.

Nach dieser detaillierten morphologischen Studie am Hühnerembryo drainieren sowohl Vena pulmonalis als auch das gemeinsame Einmündungsgebiet der systemischen venösen Zuflüsse (zukünftiger Sinus venosus) bei HH16/17 direkt, allerdings separat nicht in das Atrium, sondern in ein ihm vorgeschaltetes, morphologisch klar von ihm abzugrenzendes atriales Einflusskompartiment. Rechte und linke Komponenten dieses Einflusskompartiments werden

während der Rechtsverlagerung der gemeinsamen Mündung der systemischen Venen von HH20-24 in das rechte resp. linke Atrium inkorporiert.

Diskrepanzen hinsichtlich der Beurteilung der morphogenetisch-topographischen Beziehung zwischen zukünftigem Sinus venosus und Pulmonalvene beruhen zum einen vermutlich auf speziesspezifischen Unterschieden in der Embryonalentwicklung. Beim Säuger fehlt z.B. ein morphologisch eindeutig abgrenzbares „atriales Einflussegment“ (Soufan et al., 2004; Sizarov et al., 2010). Zum anderen und insbesondere aber basieren sie auf der „unterschiedlichen Interpretation derselben morphologischen Situation“ (Männer und Merkel, 2007).

So weist ein Teil der Untersucher dieses zusätzliche „Segment“ dem Sinus venosus zu (Tasaka et al., 1996), z.T. basierend auf der gemeinsamen *HNK1* (*Human Natural Killer cells*-Antigen)-Expression. *HNK1* markiert u.a. das sich entwickelnde Erregungsleitungssystem im Herz und wird im Sinus venosus, aber auch transient im mediastinalen Myokard, aus dem sich das dorsale Dach des gemeinsamen Atriums rekrutiert und im Myokard der Vena pulmonalis exprimiert (DeRuiter et al., 1995; Blom et al., 1999; Blom et al., 2001).

Jedoch belegen bereits frühere Studien, dass dieses Antigen lediglich migrierende Zellen im Allgemeinen markiert, was seine Instrumentalisierung in der Argumentation für einen gemeinsamen Ursprung von Sinus venosus- und Pulmonalvenenmyokard in Frage stellt (Kuratani und Kirby, 1991).

Ähnliches gilt für die gemeinsame Expression von *Podoplanin*, einem an der epithelio-mesenchymalen Transition beteiligten und auch im Erregungsleitungssystem exprimierten Molekül, das ebenfalls zu diesem Zweck herangezogen wird (Jongbloed et al., 2008; Douglas et al., 2009b).

Desweiteren wird darauf verwiesen, dass die *Nkx2.5*-Expression im entstehenden Myokard der Pulmonalvene initial mosaikartig, also unvollständig erfolgt (Groot et al., 2007).

Hinter dieser Argumentation steht im wesentlichen der Versuch, das relativ häufige Auftreten von Arrhythmien mit Ursprung im Pulmonalvenenmyokard beim Menschen zu erklären, deren Ursache man in der engen Verwandtschaft zum primär rhythmogenen Sinus venosus-Myokard vermutet. Tatsächlich hat man bei Mensch und Ratte im Vena pulmonalis-Myokard Zellen entdeckt, die morphologische Kriterien von Schrittmacherzellen aufweisen (Masani, 1986; Perez-Lugones et al., 2003).

Der andere, überwiegende Teil der Forscher betrachtet das „atriale Einflussegment“ als Teil des primitiven Atriums, zu dem es ja schließlich auch im Zuge der Inkorporation einen Beitrag in Form der dorsalen Wand leistet (Webb et al., 1998, 2000, 2001; Soufan et al., 2004; Wessels et al., 2000; Van den Berg und Moorman, 2011).

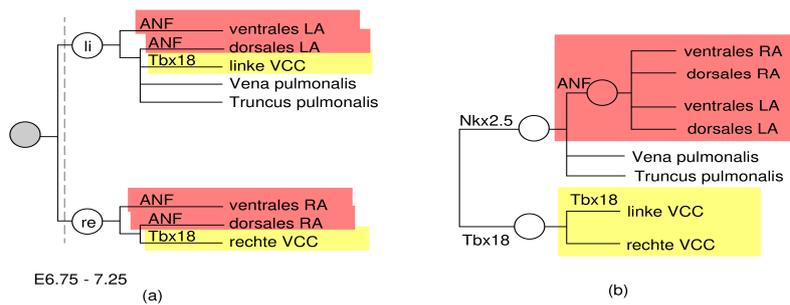
Es entsteht ebenso wie die Vena pulmonalis aus mediastinalem mesenchymalem Gewebe des Zweiten Herzfelds und exprimiert *Nkx2.5* und *Cx40*, jedoch nicht *Tbx18*, was nach Ansicht der Untersucher eine enge klonale Abstammung von Sinus venosus-Myokard weitestgehend ausschließt (Soufan et al., 2004; Sizarov et al., 2010).

Eine Untersuchung über den Ursprung der myokardialen Einflusstrakt-Progenitoren von Lescroart et al. (2012) stellte nun wiederum einen Teil der auf der Basis von Genexpression oder morphogenetischen Studien gewonnenen Erkenntnisse in Frage.

In dieser retrospektiven klonalen Analyse wurde festgestellt, dass nach der frühen, durch linksseitige *Pitx2*-Expression manifestierten Trennung der rechten und linken Komponenten des Zweiten Herzfelds nach der Gastrulation, atriales und venöses Myokard der jeweiligen Seite eine enge klonale Verwandtschaft aufweisen.

Dies gilt also auf der linken Seite für das Myokard des dorsalen linken Atriums, der Vena pulmonalis und der linken Vena cava cranialis und auf der rechten Seite für das Myokard des

dorsalen rechten Atriums und der rechten Vena cava cranialis (siehe Abb.59).



**Abb.59:** Gegenüberstellung des Stammbaumes der Progenitoren des venösen Herzpols a) laut klonaler Analyse, die eine relativ enge Verwandtschaft zwischen atrialem Myokard und Kavalvenenmyokard der jeweiligen Seite (re/li) belegt, b) laut Genexpressionsanalysen, die wiederum eine enge Verwandtschaft zwischen atrialem und Kavalvenenmyokard negieren, *Nkx2.5* (NK homeodomain5) und ANF (Atrial Natriuretic Factor, rot unterlegt): Marker atrialen Myokards, *Tbx18* (*Tbox18*, gelb unterlegt): Marker von Sinus venosus-Myokard, LA/RA-linkes/rechtes Atrium, VCC-Vena cava cranialis; modifiziert nach Lescroart et al., 2012, Abb. 6A,B

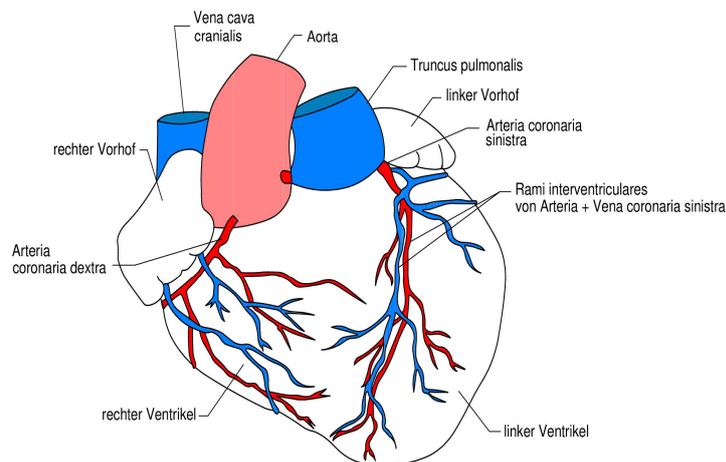
Die bedeutendste Erkenntnis aus dieser Studie ist, dass das Kavalvenenmyokard keine vom übrigen Zweiten Herzfeld völlig unabhängige Zellstammlinie („Drittes Herzfeld“) verkörpert. Das Myokard des Sinus venosus und seiner Derivate (Kavalvenen) ist also trotz deutlich abweichender Genexpression (*Nkx2.5*-; *Tbx18*+) und entgegen der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen vieler Forscher relativ eng verwandt mit dem Myokard der Atrien und der Pulmonalvene.

## 3.6 Die Entwicklung der Koronargefäße

### 3.6.1 Anerkanntes Wissen und veraltete Theorien

Die Gewährleistung einer adäquaten Versorgung des während der Embryonalentwicklung kontinuierlich wachsenden Myokards der Vorhöfe und Hauptkammern des Herzens von Vögeln und Säugetieren mit Sauerstoff und Nährstoffen in Form der passiven Diffusion ist sehr begrenzt und erfordert die Etablierung eines Herz-internen Blutgefäßsystems, des sogenannten Koronargefäßsystems (reviewed in Sedmera, 2011) (siehe Abb.60).

Es besteht aus einem arteriellen Anteil, der aus dem Stamm der Aorta entspringt, einem venösen Anteil, der über den Sinus coronarius in den rechten Vorhof drainiert sowie dazwischen geschalteten Kapillaren. Die Gefäße bestehen aus einer inneren der Basallamina aufliegenden Endothelzellschicht und Perizyten (Tunica intima), einer mittleren Schicht aus überwiegend glatter Muskulatur (Tunica media) und, jedoch nur bei größeren Koronararteriensegmenten, der äußeren Schicht (Tunica adventitia), die sich v.a. aus Bindegewebe und Fibroblasten zusammensetzt (Olivey und Svensson, 2010; reviewed in Sharma et al., 2017).



**Abb.60:** Koronargefäße des Herzens beim Menschen, modifiziert nach Universitätsklinikum Jena, <http://www.htchirurgie.uniklinikum-jena.de/Herzchirurgie/Koronare+Herzkrankheit.html>.

Die Entstehung der Koronargefäße ist eng mit der des Epikards, der äußersten Schicht des Herzens, verknüpft. Hierbei spielt nicht nur der physikalische Beitrag von Vorläuferzellen zum Aufbau der Gefäßwände eine Rolle (DeRuiter et al., 1993; Mikawa und Gourdie, 1996). Erst der intensive wechselseitige Signalaustausch zwischen benachbartem Epikard bzw. den „epicardium-derived cells“ und Myokard schafft im subepikardialen Raum ein Milieu, in dem die Progenitoren ihr volles vaskulogenes Potential entfalten können.

Während „epicardium-derived cells“ als Quelle glatter Muskelzellen und perivaskulärer Fibroblasten der koronaren Gefäßwände anerkannt sind (Mikawa und Gourdie, 1996; Dettmann et al., 1998), ist die Herkunft koronarer Endothelzellen hingegen noch immer Gegenstand intensiver Forschung (Perez-Pomares et al., 2002a; Red-Horse et al., 2010; Wu et al., 2012; Katz et al., 2012; reviewed in Sharma et al., 2017; siehe 3.6.4.1).

Dass die koronaren Endothelzellen nicht aus „epicardium-derived cells“ im engeren Sinne hervorgehen, sondern eine unabhängige Population bilden, ist mittlerweile gut belegt (Poelmann et al., 1993; Cossette und Misra, 2011; Katz et al., 2012).

Die althergebrachte Vorstellung, die Endothelzellen der KoronargefäÙe rekrutierten sich via angiogener Aussprossung aus dem Aortenendothel ist überholt. Sinus venosus-Endothel bzw. Endokard hingegen sind wesentliche Quellen für hämatopoietische Zellen zum Aufbau des KoronargefäÙendothels (Voboril und Schiebler, 1969; Hirakow, 1983; Red-Horse et al., 2010; Tian et al., 2013b; Wu et al., 2013c).

### 3.6.2 Entstehung des Epikards - eine kurze Rekapitulation

Die einschichtige epitheliale Ummantelung des Myokards, das Epikard, geht aus dem Proepikard hervor, einer ventrokaudal am venösen Herzpol, nahe dem Septum transversum gelegenen Struktur, die der Zölomserosa (Zweites Herzfeld) entstammt (Männer, 1992).

Die Identität dieser multipotenten, aktiv proliferierenden Stammzellpopulation, aus der sich auch das Myokard des Sinus venosus rekrutiert, ist gekennzeichnet durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Tbx18* und *WT1* (Perez-Pomares et al., 2004; Christoffels et al., 2006; Schlueter et al., 2006; Wang et al., 2015).

Das hohe Level an *Tbx5*-Expression im Einflusstrakt sowie im Proepikardialen Organ fördert Proliferation und Migration proepikardialer Zellen (Diman et al. 2014).

Die lokale Ausbalancierung von *BMP2*-Signalen aus dem distalen Einflusstraktmyokard und *FGF2*-Signalen aus dem Proepikard gewährleistet die Proliferation des Proepikards und verhindert die myokardiale Differenzierung proepikardialer Zellen (Schlueter et al., 2006; Kruithoff et al., 2006).

*Notch1* ist unabdingbar in die Modulation der Zelldifferenzierung im Proepikardialen Organ und benachbarten Geweben eingebunden (Del Monte et al., 2011).

Proepikardiale Zellen migrieren ab E9/ HH14 in Richtung des sich entwickelnden Herzens an die Dorsalseite der atrioventrikulären Verbindung.

Ausgehend vom Atrioventrikularkanal erfolgt die weitere Ausbreitung bis etwa E11 in einem festgelegten räumlich-zeitlichen Muster über die gesamte Herzoberfläche von der Herzbasis bis zur Apex (Viragh und Challice, 1981; Vrancken-Peters et al., 1995).

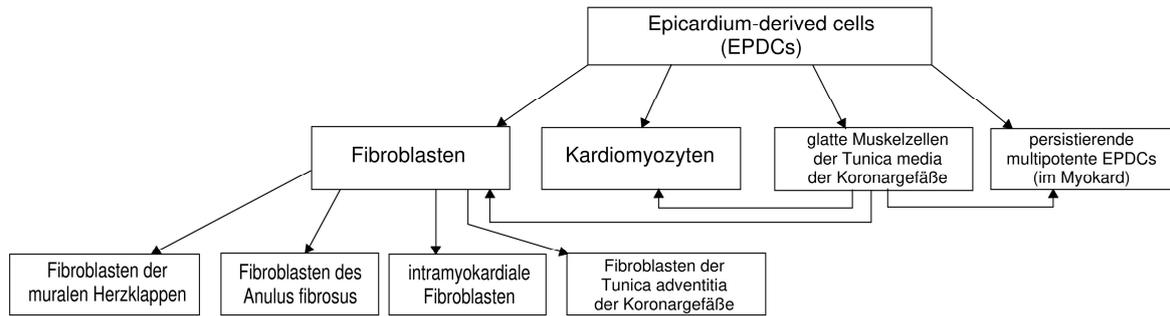
### 3.6.3 Epikardiale epithelio-mesenchymale Transition und ihre Regulation

Bereits kurz nach der Bildung der ersten zusammenhängenden primitiven epikardialen Epithelzellverbände auf der Oberfläche des Myokards transformiert ein Teil dieser Zellen nach Durchlaufen einer epithelio-mesenchymalen Transition in migratorische mesenchymale Zellen, die sogenannten „epicardium-derived cells“, die den subepikardialen Raum bevölkern (Perez-Pomares et al., 1997).

Diese Zellen sind nicht nur maßgeblich am Aufbau der koronaren GefäÙwände beteiligt, sondern als Signalgeber in jeder Phase der KoronargefäÙentwicklung unersetzlich.

Nachdem in vorangegangenen Kapiteln immer wieder auf „epicardium-derived cells“ und ihre vielfältigen Aufgaben bei der Kardiogenese eingegangen wurde, soll die folgende Übersicht (Abb.61) noch einmal die große Bandbreite ihres Entwicklungspotentials und ihrer

Beteiligung am Aufbau verschiedener Strukturen im Herzen in Erinnerung rufen:



**Abb.61:** Multipotenz der „epicardium-derived cells“; eigene Darstellung

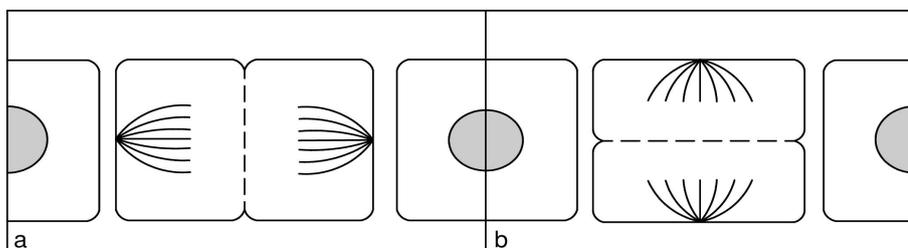
„Epicardium-derived cells“ im engeren Sinne exprimieren wie auch ihre Vorläufer im Proepikard die Transkriptionsfaktoren *Tbx18* und *WT1* und sind die Hauptquelle glatter Muskelzellen und perivaskulärer Fibroblasten für die koronaren Gefäßwände (Dettmann et al., 1998; Guadix et al., 2006).

Eindeutig an Hand des transkriptionalen Profils von ihnen abzugrenzen ist die Population (bzw. Populationen?) endothelialer Vorläuferzellen, die mit ihnen gemeinsam via Proepikard zum Herzen migriert, jedoch vermutlich ohne eine epithelio-mesenchymale Transition zu durchlaufen direkt in den subepikardialen Raum einwandert (Wilting et al., 2007; Cossette und Misra, 2011; Katz et al., 2012).

Die epithelio-mesenchymale Transition basiert auf einer Herunterregulation der interzellulären Adhäsion, Reorganisation des Zytoskeletts und Auflösung der basoapikalen Polarität der Zellen und unterliegt äußerst komplexen molekularen Interaktionen zwischen Epikard und Myokard, die schwierig von anderen Vorgängen, wie Migration und koronarer Vaskulogenese/Angiogenese, abzutrennen sind. Dennoch soll im folgenden Abschnitt versucht werden, die wichtigsten Regulationswege darzustellen.

Gerichtete Zellteilung im Epikard unter Kontrolle der Zellpolarität und möglicherweise auch der Orientierung des Spindelapparats durch  $\beta$ -Catenin ist ein wichtiger Motor für die epikardiale epithelio-mesenchymale Transition.

Wu et al. (2010) stellten fest, dass parallel zur Basalmembran verlaufende Zellteilung den Verbleib beider Tochterzellen im Epikard zur Folge hat. Hingegen verbleibt bei der perpendikulären Zellteilung, die zwischen E12.5-13.5 etwa zwei Drittel der Zellteilungen im Epikard ausmacht, nur eine Tochterzelle im Epikard, die andere transformiert in einen mesenchymalen Zelltyp und wandert in den Subepikardialraum (siehe Abb.62).



**Abb.62:** Zellteilungsmodi im Epikard, a- parallel, b- perpendikulär; eigene Darstellung

Der proepikardiale Transkriptionsfaktor *Wilms tumor suppressor 1 (WT1)* aktiviert das Enzym *RALDH2* (Retinaldehyd-Dehydrogenase 2) in Epikardzellen. Die daraufhin vermehrt epikardial produzierte *Retinsäure* induziert den Wachstumsfaktor *FGF2* in Epi- und Myo-

kard. *FGF2* aktiviert seinerseits via *Wnt9b*-Induktion  $\beta$ -Catenin (Protein), das die epithelio-mesenchymale Transition des Epikards fördert (Merki et al., 2005; Zamora et al., 2007; Guadix et al., 2011; Von Gise et al., 2011).

Daneben bewirken *WT1* und *Tbx18* über Transaktivierung des *Snail1*-Promoters die Herunterregulation von *E-Cadherin*, einem wichtigen Zelladhäsionsmolekül, auf den Epikardzellen (Martinez-Estrada et al., 2010; Takeichi et al., 2013).

*TGF* (*Transforming Growth Factor*) $\beta$ -Signale via *TGF $\beta$ -Rezeptor3* hemmen, via *TGF $\beta$ -Rezeptor1* fördern die epithelio-mesenchymale Transition im Epikard und dienen vermutlich dem „Austarieren“ dieses Prozesses (Compton et al., 2006; Compton et al., 2007; Sridurongrit et al., 2008).

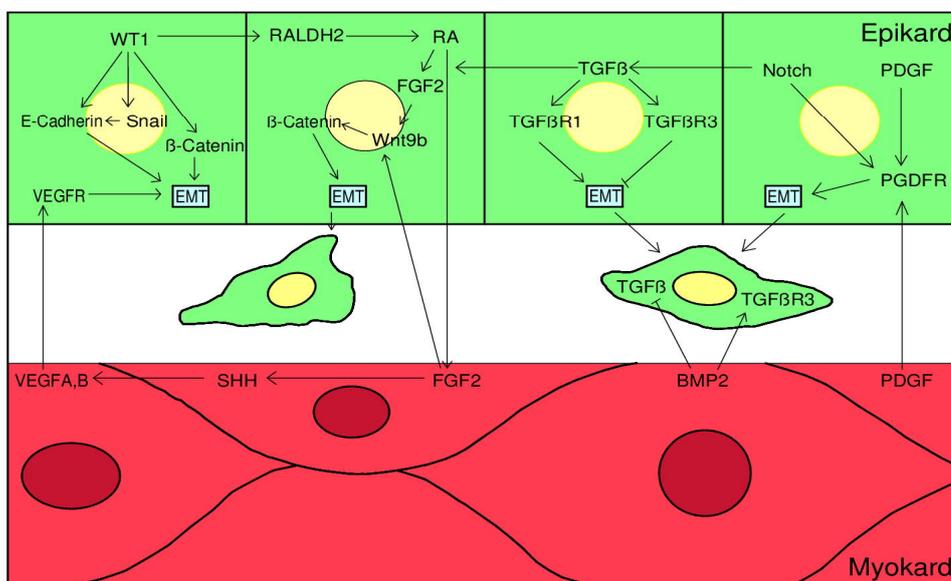
Myokardiales *BMP2* fördert via *TGF $\beta$ R3* die Invasion epikardialer Zellen und verhindert durch milde Hemmung von *TGF $\beta$*  eine frühzeitige Differenzierung in glatte Muskelzellen (Hill et al., 2012).

Die epikardialen Transkriptionsfaktoren *HIF* (*Hypoxia-inducible factor*), *Ets1* und *2* fördern diesen Prozess ebenfalls (Lie-Venema et al., 2003; Tao et al., 2013).

Myokardial und epikardial produzierter *Platelet-derived Growth Factor* (*PDGF*) fördert durch Bindung an den epikardialen *PDGF-Rezeptor $\beta$*  Delamination und Migration epikardialer Zellen (Mellgren et al., 2008).

*Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*) A aus dem Myokard bewirkt über Bindung an epikardiale *VEGF-Rezeptoren* vermutlich ebenfalls eine Induktion der epithelio-mesenchymalen Transition (Nesbitt et al., 2009) (siehe Abb.63).

Typische Strukturproteine der mesenchymalen „epicardium-derived cells“ sind *Vimentin*, das Zellmigration und Proliferation auf bisher unbekannte Weise beeinflusst, und *alpha-Smooth Muscle Actin* ( *$\alpha$ SMA*), das nicht nur mit der Differenzierung in glatte Muskulatur assoziiert ist, sondern auch allgemein mit der Aktivierung des migratorischen Verhaltens von Mesenchymzellen einhergeht (Morabito et al., 2001; Ivaska et al., 2007; Luna-Zurita et al., 2010). Abbildung 63 gibt eine Übersicht über die beschriebenen molekularen Regulationsvorgänge.



**Abb.63:** Regulation der epikardialen epithelio-mesenchymalen Transition (EMT), WT1: Wilms tumor1, VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor, RA: Retinsäure, RALDH2: Retinaldehyd-Dehydrogenase2, FGF2: Fibroblast Growth Factor 2, Wnt9b: Protein des kanonischen Wnt-Signalwegs, TGF $\beta$ : Tumor Necrosis Factor $\beta$ , TGF $\beta$ R1/3 Tumor Necrosis Factor-Rezeptoren 1/3, PDGF: Platelet-derived Growth Factor, PDGFR: Platelet-derived Growth Factor-Rezeptor, VEGFA,B: Vascular Endothelial Growth Factor A,B, SHH: Sonic hedgehog, BMP2: Bone Morphogenetic Protein2; Erklärung im Text, eigene Darstellung

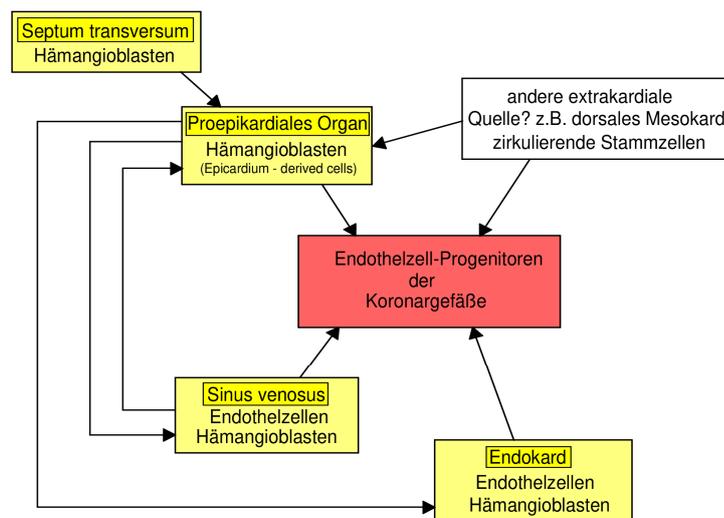
### 3.6.4 Ursprung und Genese des koronaren Endothels

#### 3.6.4.1 Herkunft der koronaren Endothelzellen

Nach der Entdeckung, dass die proepikardiale Serosa eine heterogene Zellpopulation verkörpert, die neben den proepikardialen *Tbx18*- und *WT1*-exprimierenden Zellen im engeren Sinne auch andere Populationen mit abweichendem, .z.T. auch überschneidendem transkriptionalen Profil und hämatopoietischen Eigenschaften beherbergt, dominierte in den letzten zwei Dekaden die Überzeugung, dass ein Großteil der koronaren Endothelzellen aus diesem Progenitorpool stammen würde (Poelmann et al., 1993; Männer, 1999; Perez-Pomares et al., 2002a; Cosette und Misra, 2011; Katz et al., 2012)

Als weitere Quellen koronarer Endothelzellen identifizierte man das Sinus venosus-Endothel sowie das atriale und ventrikuläre Endokard (Red-Horse et al., 2010; Tian et al., 2013; Wu et al., 2012).

Aktuellere Studien auf der Grundlage von Schicksalsverfolgung mit spezifischen Reportergenen, die eine Unterscheidung der drei Progenitorquellen gewährleisten, belegen nun aber, dass der deutlich überwiegende Anteil koronaren Endothels sich aus dem Endothel des Sinus venosus rekrutiert, gefolgt vom Beitrag des Endokards, wohingegen der Anteil proepikardialer Endothelzellprogenitoren weniger als 20 Prozent beträgt (Chen et al., 2014; Zhang et al., 2016). Ob diese drei angenommenen koronaren Endothelzell-Vorläuferpopulationen aber tatsächlich strikt voneinander zu trennen sind bzw. Ausgangspunkte für eigenständige vaskulo- bzw. angiogene Ereignisse sind, bleibt abschließend zu belegen (siehe Abb.64).



**Abb.64:** Potentielle Quellen koronarer Endothelzellvorläuferzellen; eigene Darstellung

#### 3.6.4.2 Entstehung und Ausbreitung vaskulärer Plexus

**Angio-  
genese:**  
Wachstum  
neuer Blutge-  
fäße aus be-  
stehenden  
Blutgefäßen  
durch Spross-  
ung oder  
Intussuszep-  
tion

Am Beginn der Koronargefäßentwicklung steht die Bildung primitiver endothelialer Gefäßflechte (Plexus), hoch verzweigter Netzwerke von kleinen Gefäßen. Diese erfolgt zunächst primär und überwiegend durch angiogenes\* Aussprossen von dedifferenziertem Sinus venosus-Endothel durch das Myokard auf die Oberfläche des Herzens an der Dorsalseite des Atrioventrikularkanals im Subepikardialraum (Patan, 2000; Red-Horse et al., 2010; Chen et al., 2014b).

Hämatopoietische Vorläuferzellen, die mit den proepikardialen Zellen von der Proepikardialen Serosa an die Herzoberfläche eingewandert sind sowie in das Myokard einspro-

sende Endokardzellen, spielen nach neuesten Erkenntnissen nur eine untergeordnete Rolle (Chen et al., 2014b; Zhang et al., 2016).

Ab E11.5 entstehen sowohl subepikardial als auch etwas zeitversetzt intramyokardial aus eingewanderten Hämangioblasten Blutinseln, die sich untereinander verbinden und Röhren bilden, die sich wiederum untereinander vernetzen (Vaskulogenese). Die Plexus verzweigen sich via Angiogenese immer weiter und expandieren subepikardial, wobei sie perpendicular auch ins Myokard vordringen, über die gesamte Herzoberfläche von der Basis zur Apex (Lavine et al., 2006; Tian et al., 2013b; Chen et al., 2014b).

Aus den oberflächlicher befindlichen subepikardialen Plexus entstehen überwiegend venöse Gefäße, während die tiefer gelegenen intramyokardialen Plexus in Gefäße mit arteriellem Phänotyp sowie Kapillaren differenzieren (Lavine et al., 2008; reviewed in Sharma et al., 2017).

Besonders ausgeprägt ist die Plexusbildung im Bereich späterer großer Hauptgefäße, im atrioventrikulären und interventrikulären Sulcus sowie an der ventrikulo-arteriellen Verbindung (Männer et al., 1992; Gonzalez-Iriarte et al., 2003).

An der ventrikulo-arteriellen Verbindung (Basis des Ausflusstrakt) entsteht der peritrunkale Ring, ein Gefäßkomplex, aus dem ab E12.5 Endothelzellen zum Aufbau der zwei proximalen Koronararterienstämme (*Arteria coronaria dextra et sinistra*) rekrutiert werden. Diese endothelialen Stränge penetrieren die noch weitgehend undifferenzierten Vorläuferzellen der Tunica muscularis im Bereich der gegenüberliegenden rechten und linken Sinus der Aortenklappen, um Zugang zum systemischen Blutkreislauf zu gewährleisten (Poelmann et al., 1993; Tian et al., 2013a; Chen et al., 2014a).

Die Koronarvenen nehmen bereits ab etwa E12.5 die Verbindung zum Sinus venosus auf und drainieren später über den Koronarsinus ins rechte Atrium (Anderson et al., 2006a; Katz et al., 2012).

### 3.6.4.3 Regulation von Vaskulogenese und Angiogenese

Der epikardiale Transkriptionsfaktor *Tbx18* fördert durch die Induktion vaskulo- bzw. angiogener Signalwege, wie z.B. *VEGFA*, *Angiopoietin 1* und Komponenten des *Sonic hedgehog*-Signalwegs die subepikardiale Plexusbildung (Wu et al., 2013c).

Die Gruppe der *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*-Wachstumsfaktoren, allen voran *VEGFA* mit seinen drei Isoformen steht im Zentrum vaskulogener/angiogener Regulation (Tammela et al., 2005; Tomanek et al., 2002 und 2006). Die Induktion von *VEGFA* im Myokard erfolgt durch epikardiale *FGF9*-Sekretion, wodurch *FGFR1/2* (*FGF*-Rezeptoren) im Myokard aktiviert werden. Diese wiederum induzieren die Expression von *Shh* (*Sonic hedgehog*), ein parakrin agierendes Protein, das wiederum die myokardiale *VEGFA*-Expression aktiviert (Lavine et al., 2006).

*VEGFA* bindet seinerseits an den endothelialen *VEGFR2*, was die Plexusbildung stimuliert. Der lösliche *VEGFR1* bindet *VEGFA* und scheint notwendig für die Ausbalancierung der endokardialen Plexusbildung (Zhang und Zhou, 2013).

*VEGFC*-Signale vom Epikard wiederum stimulieren das Aussprossen des Sinus venosus-Endothels in den subepikardialer Raum (Chen et al., 2014b). Dasselbe gilt für myokardiales *Angiopoietin1* (Arita et al., 2014).

Das Zusammenspiel myokardial exprimierter *VEGFs*, die an endothelspezifische Rezeptoren (*VEGFR2*) binden, und *FGF*-Wachstumsfaktoren (v.a. *FGF2*) ist unerlässlich für eine adäquate Ausprägung der Endothel-Plexus, wobei *VEGF* primär die Tubulogenese (Röhrenbildung) und *FGF2* die Endothelzellproliferation steuert (Pennisi und Mikawa, 2005; Tomanek et al., 2001 und 2010).

*FGF2* und *18* scheinen spezifisch die migratorischen Fähigkeiten der Endothelzellen zu fördern. Weitere in Myokard und Epikard exprimierte *FGFs* (*1,4,8,9,16,20*) spielen für die

Koronargefäßentwicklung eine untergeordnete, möglicherweise redundante Rolle (Lavine et al., 2005; Tomanek et al., 2010).

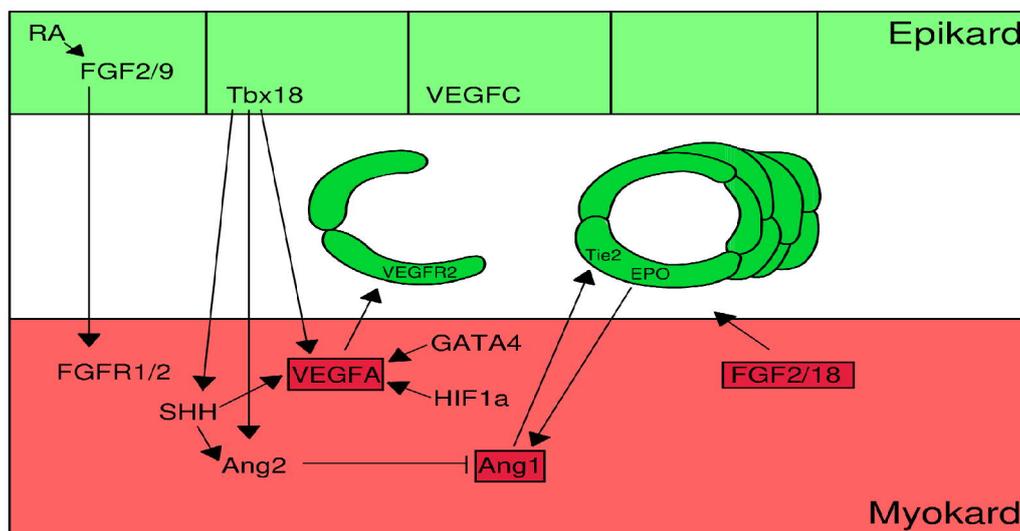
Neben *VEGF* wird auch der Wachstumsfaktor *Angiopoietin 2 (Ang2)* durch *Shh* im Myokard induziert (Lavine et al., 2006).

Die myokardiale Expression von *Ang1* scheint unter der Kontrolle von *Erythropoietin* zu stehen. *Erythropoietin* wird, wie auch sein Rezeptor, von den Endothelzellen bzw. hämatopoietischen Vorläuferzellen selbst exprimiert und ist unerlässlich für die Angiogenese v.a. für die subepikardialen Gefäße (Kertesz et al., 2004; Arita et al., 2014).

*Ang1* und *Ang2* sind, mediiert über ihren in Epikard, Endokard und Endothelzellen exprimierten Rezeptor *Tie2*, unverzichtbarer, von *VEGF* unabhängiger Bestandteil der vaskulogenen und angiogenen Regulationsmechanismen.

*Ang1* dient nicht nur dem Erhalt der Integrität von Epikard, Myokard und Endokard, sondern ist vermutlich auch notwendig für das Überleben und die Migration von Endothelzellen, sowie für die Stabilisierung der Gefäße (Ward et al., 2004; Augustin et al., 2009). Als *Ang1*-Antagonist fungiert *Ang2* wahrscheinlich in der Hauptsache als Regulator des *Ang1*-Levels (Yuan et al., 2009) (siehe Abb.65).

Der myokardiale Transkriptionsfaktor *Fog (Friend of gata) 2* übt ebenfalls eine kritische Rolle in der koronaren Angiogenese aus durch Förderung proangiogener und Hemmung antiangiogener Faktoren (Zhou et al., 2009; reviewed in Sharma et al., 2017).



**Abb.65:** Transkriptionale Regulation von Vaskulogenese und Angiogenese im Herzen, RA: Retinsäure, FGF2/9/18: Fibroblast Growth Factor2/9/18, FGFR1/2: Fibroblast Growth Factor-Rezeptor1/2, Tbx18: Tbox18, VEGFA/C: Vascular Endothelial Growth FactorA/C, VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor2, SHH: Sonic hedgehog, Ang1/2: Angiopoietin1/2, HIF1a: Hypoxia-inducible factor 1 alpha; eigene Darstellung

Hypoxie scheint ein wichtiger Stimulus der Koronargefäßentwicklung, insbesondere im Ausflusstrakt zu sein. Lokale Hypoxie führt im Ausflusstrakt-Myokard zur Expression von Transkriptionsfaktor *HIF (Hypoxia-inducible factor)1a* und *HIF2a*.

*HIF1a* führt zu verstärkter *VEGF*-und *VEGFR2*-Expression an der Aortenbasis (Sugishita et al., 2004; Wikenheiser et al., 2009). Speziell *VEGFC* und das Chemokin *Cxcl12* werden vermehrt zur Zeit der Etablierung der Koronararterienstämme im Bereich des Ausflusstrakts produziert. Sie sind essentiell für die Verbindung der koronaren endothelialen Plexus, die diese Moleküle durch die Rezeptoren *VEGFR2/3* resp. *Cxcr4* binden, mit der Aorta (Chen et al., 2014a; Ivins et al., 2015). *VEGFC* und *Cxcl12* werden gleichsam vom Stamm der Arteria pulmonalis exprimiert. Dass die zwei Koronararterienstämme sich aber an stereotypen Stellen am Aortenstamm (rechter und linker Klappensinus) etablieren und dort mit der Aorta statt mit der Pulmonalarterie anastomosieren, hängt wahrscheinlich mit dem spezifischen Vorkommen von Kardiomyozyten im Umkreis der zukünftigen Eintrittsstelle der Koronararterien an der

Aorta zusammen (Chen et al., 2014a). Möglicherweise produzieren diese Kardiomyozyten ein noch nicht identifiziertes Signalmolekül, das die koronaren Endothelzellen leitet. Auch der *BMP*-Signalweg ist lokal in diese Prozesse eingebunden und könnte eine Rolle spielen in der Kardiomyozyten-abhängigen Determination der Eintrittsorte der Koronararterienstämme (Dyer et al., 2014; Ivins et al., 2015; Cavallero et al., 2015).

Nach Anastomosierung mit dem Aortenendothel und daraus resultierender Versorgung mit arteriellem Blutfluss kommt es zur Remodellierung des gesamten koronaren Gefäßgeflechts mit Expansion der proximalen Gefäße vermutlich durch Mechanismen wie Fusion kleiner Gefäße und retrograde (gegen den Blutstrom) Migration von Endothelzellen (Waldo et al., 1990; Lavine et al., 2008; Sato et al., 2010; Udan et al., 2013).

#### 3.6.4.4 Etablierung der arteriellen vs. venösen Identität der Endothelzellen

Ab E12.5 (Maus) bzw. HH31 (Huhn) anastomosieren die Koronararterienstämme mit der Aorta. Der dadurch einsetzende Blutfluss ist der wesentliche Trigger für die geno- und phänotypische Remodellierung der Koronargefäße, wie dies auch in anderen embryonal entstehenden Gefäßbetten der Fall ist (Le Noble et al., 2004; Lucitti et al., 2006, 2007; Chen et al., 2014a, b; Volz et al., 2015; Ivins et al., 2015).

Bereits während der Bildung der koronaren Plexus scheint sich zumindest auf molekularer Ebene eine Segregation arterieller (intramyokardial) und venöser (subepikardial) Gefäße zu vollziehen. Sie manifestiert sich durch die Expression des Liganden *ephrinB2* in arteriellen und seines Rezeptors *EPHB4* in venösen Endothelzellen, was die Bedeutsamkeit eines reziproken Signalaustauschs zwischen beiden Endotheltypen für die arterio-venöse Musterbildung betont (Wang et al., 1998; Lavine et al., 2008).

Induziert wird die *ephrinB2*-Expression vermutlich durch nur im arteriellen Endothel exprimierte *Notch*-Liganden wie *Delta-like4* und *Jagged1*. Die Aktivierung des *Notch*-Signalwegs, der seinerseits durch *VEGFA*-*VEGFR*-Interaktion (*VEGFA* aus dem Myokard, *VEGFR* des Endothels) aktiviert wird, hemmt die venöse Differenzierung des Endothels und stabilisiert die arterielle Identität (Lawson et al., 2001, 2002; Fischer et al., 2004; Van den Akker et al., 2008a; Grieskamp et al., 2011; Wu et al., 2012; Wythe et al., 2013).

„Epicardium-derived cells“, die zunächst als Perizyten die arteriellen Koronarendothelzellen umgeben, exprimieren mit einsetzendem Blutfluss *Notch3*, der den Rezeptor *Jagged1* auf den Endothelzellen aktiviert. *Jagged1*-Aktivität ist unerlässlich für die Arteriogenese (Domenga et al., 2004; Liu et al., 2010; Del Monte et al., 2011; Hofmann et al., 2012; Volz et al., 2015).

Auch der *Sonic hedgehog* (*Shh*)-Signalweg ist als Förderer von *VEGF* zumindest indirekt in die Determinierung von arteriellem vs. venösem Schicksal des Endothels eingebunden (Lavine et al., 2008). Spezifisch vom Myokard empfangene *Shh*-Signale sind für die Entwicklung der (subepikardialen) Koronarvenen essentiell, während die intramyokardialen, arteriellen Endothelzellen auf *Shh*-Signale an die sie umgebenden perivaskulären Zellen angewiesen sind. Dies führt vermutlich im Fall der subepikardialen Plexus zu einer eher diffusen und im Fall der intramyokardialen Plexus zu lokal konzentrierter *VEGF*-Produktion. Darüberhinaus weisen diese Untersuchungen auf eine, möglicherweise von der *VEGF*-Konzentration abhängigen, früher stattfindende Differenzierung arterieller im Gegensatz zu venösen Gefäßen hin, ein Umstand, der ebenfalls eine Rolle für die Bestimmung der endothelialen Identität spielen könnte (Lavine et al., 2008).

*VEGF* induziert darüberhinaus die Expression des Enzyms *endotheliale Stickoxidsynthase 3* (*eNOS3*), eines lokalen Stickoxidproduzenten. Diese Substanz ist für die koronare Arteriogenese ebenfalls notwendig (Liu et al., 2014).

Über die Mechanismen der Etablierung der venösen Identität der Koronargefäße ist wenig bekannt. Neben der exklusiven Expression des Rezeptors *EPHB4* ist dem venösen Endothel

auch die Expression des Transkriptionsfaktors *COUPTFII* zu eigen, der den *Notch*-Signalweg supprimiert (You et al., 2005; Lin et al., 2007).

### 3.6.5 Bildung der koronaren Gefäßwände

Nach Entstehung der primitiven koronaren endothelialen Gefäßplexus und deren Remodellierung reifen sie ab etwa E12.5 (HH27) durch die Akquirierung von vaskulären glatten Muskelzellen, die sich je nach hämodynamischer Belastung in einer bis zu mehreren Schichten um das Endothel legen, und von perivaskulären Fibroblasten.

Diese Prozesse verlaufen jedoch nicht völlig synchron im gesamten koronaren Gefäßbett, sondern zeitversetzt dem Ausbreitungsmodus des Epikards von der Herzbasis zur Apex folgend mit der gleichzeitigen Präsenz von relativ reifen Gefäßen und kleinen Aggregaten von Hämangioblasten.

Remodellierung und Reifung dauern bis ins postnatale Stadium an (Kattan et al., 2004).

#### 3.6.5.1 Herkunft und Rekrutierung glatter Muskelzellen für die Koronargefäße

Die *Tbx18*- und *WT1*-exprimierenden Zellen des (Pro-)Epikards sind die hauptsächlichen Vorläufer glatter Muskelzellen und Fibroblasten/Perizyten der Koronargefäße (Zhou et al., 2008; Grieskamp et al., 2011).

Eine Ausnahme hiervon bilden die proximalen Koronararterienstämme. Hier rekrutiert sich die Tunica media zum Teil aus kardialen Neuralleistenzellen (Jiang et al., 2000; Arima et al., 2012).

Aber auch dem Endokard entstammendes Herzkissenmesenchym konnte als Quelle für Zellen der koronaren Gefäßwände, v.a. im Ventrikelseptum, identifiziert werden (Chen et al., 2016).

Nach der Transformation in mesenchymale Zellen (s. 3.6.3) wandern die „epicardium-derived cells“ in den subepikardialen Raum und in das Myokard (Zhou et al., 2008; Grieskamp et al., 2011). Die Festlegung der Zellen auf ein Schicksal als glatte Muskelzelle oder Fibroblast manifestiert sich bereits in diesem Stadium durch Expression des *Platelet-derived Growth Factor Receptor  $\beta$*  resp. *a* (*PDGFR $\beta$ /a*) (Mellgren et al., 2008; Smith et al., 2011). Fibroblasten-Vorläufer exprimieren fortan den Transkriptionsfaktor *Tcf21*, der spezifische Gene der glatten Muskulatur supprimiert (Braitsch et al., 2012; Acharya et al., 2014).

Verschiedene, in Epikard und „epicardium-derived cells“ exprimierte Rezeptoren medieren über Interaktion mit Signalmolekülen aus dem Myokard deren Migration.

Der dominante Signalweg in diesem Zusammenhang ist der via myokardial exprimiertem Wachstumsfaktor *Platelet-derived Growth FactorA* und seinem in „epicardium-derived cells“ exprimierten Rezeptor *PDGFR $\beta$*  bzw. *PDGFRa*. Er bewirkt über Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts die Ausbildung von Zellfortsätzen (Mellgren et al., 2008). Eine lokal konzentrierte Expression von Wachstumsfaktor *PDGFB* in koronaren Endothelzellen übt vermutlich einen starken chemotaktischen Reiz auf die migrierenden „epicardium-derived cells“ aus (Hellstrom et al., 1999; Van den Arker et al., 2005; Van den Akker et al., 2008b).

Myokardiales *BMP2* induziert via epikardialem *Transforming Growth Factor $\beta$ -Rezeptor3* (*TGF $\beta$ R3*) die Invasion dieser Zellen in das Myokard (Hill et al., 2012).

Myokardiales *FGF10* stimuliert über *FGFR2b* in „epicardium-derived cells“ ebenfalls ihre Migration (Vega-Hernandez et al., 2011). Der epikardiale Rezeptor *FGFR1* spielt auch eine wichtige Rolle bei diesem Prozess (Pennisi und Mikawa, 2009).

*Thymosin $\beta$ 4*, ein im Myokard exprimiertes Aktin-Monomer-Bindungs-Protein, ist ebenfalls in die Migration von „epicardium-derived cells“ involviert (Smart et al., 2007).

### 3.6.5.2 Differenzierung der „epicardium-derived cells“

Die „epicardium-derived cells“ begleiten die Endothelzellen des sich ausbreitenden Koronarplexus, sobald er den subepikardialen Raum erreicht in Form von Perizyten. Dies erfolgt vermutlich durch Interaktion zwischen *PDGFB* (aus den Endothelzellen) und *PDGFR $\beta$*  (auf den EPDCs). Diese "vorläufigen" Perizyten sind als intermediäre Progenitoren von vaskulären glatten Muskelzellen aufzufassen (Volz et al., 2015).

Durch den Blutfluss stimulierte *Notch3*-Expression in den Perizyten induziert dann die Differenzierung in vaskuläre glatte Muskelzellen, die sich in der Expression der spezifischen Marker wie *SMA* (*Smooth Muscle Actin*) und *SM-Mhc* (*Smooth Muscle-Myosin heavy chain*) manifestiert (Liu et al., 2010; Grieskamp et al., 2011; Volz et al., 2015).

*Retinsäure* und *VEGF* hemmen die vorzeitige Differenzierung von „epicardium-derived cells“ in glatte Muskelzellen. Sowohl das Epikard als auch seine mesenchymalen Derivate enthalten das partiell unter *WT1*-Kontrolle stehende *Retinsäure*-generierende Enzym *RALDH2* (*Retinaldehyd-Dehydrogenase2*), wodurch autokrine und parakrine Signalmechanismen greifen (Azambuja et al., 2010; Guadix et al., 2011).

Mit zunehmendem Abstand vom Epikard wird die autokrine *Retinsäure*-Produktion eingestellt und der Einfluss epikardialer Signale schwächer.

Bei beginnender Blutzirkulation in den Koronargefäßen und der damit einhergehenden verbesserten Sauerstoffversorgung wird die Bildung von *Retinsäure* und *VEGF* in Epikard und Myokard herunterreguliert (Tomanek et al., 2002; Tomanek et al., 2003). Dadurch entfällt der hemmende Effekt auf die Differenzierung der „epicardium-derived cells“.

### 3.6.5.2 Bedeutung perivaskulärer und interstitieller Fibroblasten

Die Mehrzahl embryonaler perivaskulärer und interstitieller Fibroblasten entstammt den „epicardium-derived cells“ (Norris et al., 2008; Cai et al., 2008).

Obgleich Migration und Differenzierung unter dem wohl bekannten Einfluss von *PDGF*, *FGF*, *TGF* und *Notch* stehen (s.6.5.1 und 6.5.2), repräsentieren die Fibroblasten eine recht heterogene, auf molekularer Ebene kaum charakterisierte Zellpopulation (Olivey et al., 2006; Snider et al., 2009; Del Monte et al., 2011). Durch der jeweiligen Entwicklungsphase angepasste Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten und diverser Wachstumsfaktoren beeinflussen sie maßgeblich die Kontraktionseigenschaften des Myokards und stimulieren u.a. Angiogenese und die Proliferation der Kardiomyoblasten (Chintalgattu et al., 2003; Miragoli et al., 2006; Leda et al., 2009).

Die proliferationsfördernde Aktivität der Fibroblasten manifestiert sich z.B. in der Sekretion von *Fibronektin* und *Kollagen* (Extrazelluläre Matrixkomponenten, Proteine) sowie *HBEGF* (*Heparin-binding EGF-like Growth Factor*, Wachstumsfaktor).

$\beta$ -*Integrin*-Rezeptoren auf der Oberfläche von Kardiomyoblasten binden *HBEGF*. Eine proliferationssteigernde Antwort erfolgt jedoch nur bei gleichzeitiger Interaktion der Rezeptoren mit *Fibronektin* und *Kollagen* (Leda et al., 2009).

Darüberhinaus modulieren Fibroblasten auch durch Einbindung in die Signaltransduktion maßgeblich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzmuskels (Miragoli et al., 2006; Zhou et al., 2010).

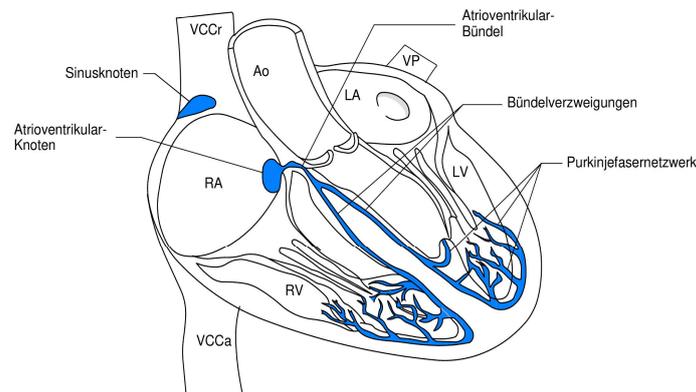
### 3.7. Entstehung des kardialen Erregungsleitungssystems

#### 3.7.1 Bewährte Erkenntnisse und veraltete Ansichten

Die Herzmuskulatur zeichnet sich ab der Entstehung des geraden Herzschlauchs durch intrinsische Aktivität (Automatie) aus. Dieser Begriff umschreibt die besondere Fähigkeit von Zellen, ohne externen Stimulus spontan Aktionspotenziale zu generieren und weiterzuleiten und dadurch rhythmische Kontraktionen zu erzeugen (Eckert et al., 1988; Mangoni und Nargeot, 2008). Diese Eigenschaft des Myokards, die es mit der glatten Muskulatur der Eingeweide teilt, ist unerlässliche Voraussetzung, um das Blut durch den Körper zu befördern.

Nach anfänglich peristaltischer Kontraktion im geraden Herzschlauch und Akquirierung der Schrittmacherfunktion durch den kaudalen Herzpol wird diese Funktion im reifen Herzen von miteinander verbundenen, sich phäno- und genotypisch markant vom Arbeitsmyokard absetzenden, in seiner Gesamtheit als Erregungsleitungssystem des Herzens bezeichneten, myokardialen Strukturen, übernommen (Kamino et al., 1981; Seidl et al., 1981; Rüsse und Sinowatz, 1998; Hyttel et al., 2010).

Seine morphologischen Substrate im adulten Säugerherzen sind der Sinusknoten (Synonym: Sinuatrialknoten), der Atrioventrikularknoten, das Atrioventrikulärbündel (Synonym: His-Bündel), rechte und linke Bündelverzweigungen und die Purkinjefasern (Rüsse und Sinowatz, 1998; McGready et al., 2006; Hyttel et al., 2010) (siehe Abb.66).



**Abb.66:** Lokalisation der erregungsleitenden Strukturen im Herzen, RA: rechtes Atrium, LA: linkes Atrium, RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel, VCCr: Vena cava cranialis, VCCa: Vena cava caudalis, Ao: Aorta, VP: Vena pulmonalis, Truncus pulmonalis verdeckt; modifiziert nach Christoffels et al., 2010, Abb. 1C

Im reifen Herzen weisen die Zellen des im rechten Atrium befindlichen Sinusknotens die höchste intrinsische Exzitationsrate auf und fungieren daher als führende Schrittmacher, d.h. sie determinieren die Herzfrequenz (Keith und Flack, 1907; Mikawa und Hurtado, 2007; Hyttel et al., 2010).

Nach rascher Weiterleitung der elektrischen Erregung durch die Atrien, wird sie mittels der bindegewebigen Isolationsschicht epikardialen Ursprungs zwischen Atrien und Ventrikeln, dem Anulus fibrosus, im Atrioventrikularknoten verzögert, um die diastolische Füllung der Ventrikel zu gewährleisten (Davies und Francis, 1946; Dobrzynski et al., 2003; McGready et al., 2006).

Von dort aus verbreitet sich der Impuls über die schnell leitenden Elemente des ventrikulären Erregungsleitungssystems, namentlich das Atrioventrikulärbündel, die Bündelverzweigungen

und die Purkinjefasern, um das Ventrikelmyokard nach Abschluss der Septierungsvorgänge von der Apex zur Basis zu aktivieren (Reckova et al., 2003).

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts war es möglich, an Hand histologischer Kriterien Zellen des Erregungsleitungssystems von denen des Arbeitsmyokards abzugrenzen (s. 3.7.2; Aschoff, 1910; Mönckeberg, 1910; reviewed in Anderson et al., 2009; Rüsse und Sinowatz 1998 und 2015).

Später entwickelte immunhistochemische Methoden zeigten eine ausgedehntere Verteilung dieser Zellen als ursprünglich angenommen und erlaubten eine umfassende morphogenetische Betrachtung (Anderson et al., 1981a, b; Lamers et al., 1991; Moorman et al., 1998; Anderson et al., 2009; Pauza et al., 2013).

Im veralteten, stark abstrahierenden Segmentmodell (auch Ringmodell) korrelieren die Vorläuferzellen des Erregungsleitungssystems mit konstriktiven Zonen zwischen den expandierenden Segmenten im geraden Herzschauch (Benninghoff, 1923; Wenink et al., 1976). Obgleich dieses Modell abzulehnen ist, existieren die erwähnten Konstriktionen durchaus nach dem Looping, entsprechen Regionen zukünftigen Erregungsleitungsgewebes und exprimieren spezifische Marker des Erregungsleitungssystems (reviewed in Moorman und Christoffels, 2003; Blom et al., 1999; Jongbloed et al., 2004).

Nicht unreflektiert sollte man im Bezug auf die Strukturen des Erregungsleitungssystems von spezialisiert sprechen. Denn im Vergleich zu Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards, die im Verlauf ihrer Differenzierung einen hohen Grad an anatomischer und funktioneller Spezialisierung erreichen (siehe 3.7.2.1), konservieren die Kardiomyozyten des Erregungsleitungssystems überwiegend Eigenschaften des „primitiven“, embryonalen Myokards.

Auf der anderen Seite aber weist eine der Funktion angepasste veränderte Ausstattung dieser Zellen mit Ionenkanälen, Neurofilamenten und zytoskelettalen Proteinen auch auf eine zunehmende Anpassung/Spezialisierung hin (Gorza et al., 1989; Virtanen et al., 1990; Zahler et al., 1992; Gorza et al., 1993; Davis et al., 1994; Ya et al., 1997; Rosenthal und Harvey, 2010).

Die lange Zeit vermutete zelluläre Beteiligung von Neuralleistenzellen und/oder „epicardium-derived cells“ am Aufbau des Erregungsleitungssystems wurde weitestgehend widerlegt (Cheng et al., 1999; Davis et al., 2001).

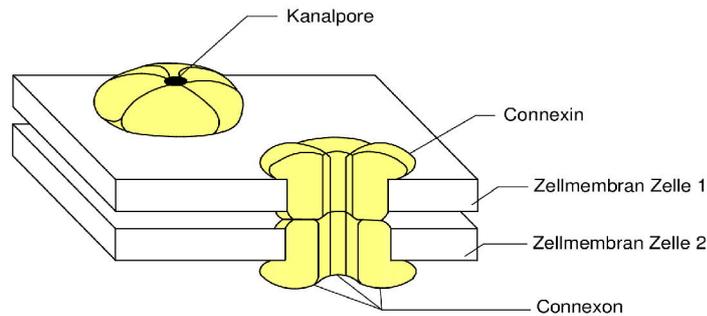
### 3.7.2 Eigenschaften und Herkunft der Zellen des Erregungsleitungssystems

#### 3.7.2.1 Charakteristika und Diversifikation von erregungsleitendem Myokard und Arbeitsmyokard

Das Myokard des primären Herzschauchs ist noch homogen. Seine im Verhältnis zum Arbeitsmyokard kleinen Zellen besitzen kaum entwickelte Sarkomerstrukturen und Sarkoplasmatische Retikula, was eine schwache Kontraktilität bedingt.

Die spezifische Zusammensetzung und Dichte von Gap Junctions und Ionenkanälen (v.a. geringe Anzahl an schnell leitenden Natriumkanälen) resultiert in einer geringen elektrischen Kopplung und langsamer Erregungsleitung als Voraussetzung für die Aufladung des Membranpotentials bis zu einem bestimmten Schwellenwert mit nachfolgender Depolarisation benachbarter Zellen (Joyner und Van Capelle, 1986; Canale und Campbell, 1986; De Jong et al., 1992).

*Connexine* spielen eine Schlüsselrolle bei der Impulspropagation. Es handelt sich hierbei um Proteine, die als Hexamer einen Halbkanal (Connexon) an einer Zytoplasmamembran bilden. Die Einheit zweier zwischen dem Zytoplasma zweier Zellen einen funktionellen Kanal bildenden Connexone bezeichnet man als Gap Junction (Manjunath und Page, 1985; Van Veen et al., 2001) (siehe Abb.67).



**Abb.67:** Aufbau der Gap junctions, 2 benachbarte Connexone bilden eine Gap junction, modifiziert nach Van Veen et al., 2001, Fig.1A

Im Herz existieren drei bzw. bei der Maus vier Haupt-Isoformen von *Connexinen*, deren Bezeichnung nach ihrer theoretischen Molekülmasse erfolgt und deren Leitungseigenschaften auf der unterschiedlichen Größe und damit Durchlässigkeit der von ihnen gebildeten Gap Junctions beruht:

- (1) *Connexin40* bildet schnell leitende Gap Junctions und wird im atrialen Myokard, Atrioventrikularknoten, Atrioventrikulärbündel und in den ventrikulären Erregungsleitungskomponenten exprimiert (Gros et al., 1994; Delorme et al., 1995).
- (2) *Connexin43* wird überwiegend in atrialem und ventrikulärem Arbeitsmyokard exprimiert zum Aufbau schnell leitender Gap Junctions (Fromaget et al., 1992; Delorme et al., 1997).
- (3) *Connexin45* produziert Gap Junctions mit schlechten Leitungseigenschaften und wird hauptsächlich in Sinusknoten, Atrioventrikularknoten, aber auch in Atrioventrikulärbündel und Bündelverzweigungen exprimiert (Van Veen et al., 2005; Verheijck et al., 2001).
- (4) *Connexin30.2* ist ein Maus-spezifisches, ultra-kleine, schlecht leitende Gap Junctions bildendes Connexin, dessen Expression auf Sinusknoten, Atrioventrikularknoten und Atrioventrikulärbündel beschränkt ist (Miquerol et al., 2003; Kreuzberg et al., 2005; Gros et al., 2010).

Während des Loopings expandiert das schnell proliferierende atriale und ventrikuläre Arbeitsmyokard an bestimmten Stellen des Herzschlauchs auf Kosten des langsam proliferierenden primären Myokards, das daraufhin auf spezifische Regionen beschränkt ist (sinuatriale, atrioventrikuläre, interventrikuläre Region und Ausflusstrakt). Die Überreste des primären Myokards an der inneren Kurvatur des rotierenden Herzschlauchs stellen eine Art Grundgerüst für die Strukturen des kardialen Erregungsleitungssystems dar (Moorman und Christoffels, 2003; Soufan et al., 2006).

Im Gegensatz zum primären („primitiven“/ embryonalen) Myokard ist das Arbeitsmyokard gekennzeichnet durch geringe Automtizität, hohe Leitungsgeschwindigkeit und eine hohe Kontraktilität bedingt durch Präsenz spezifischer Gap Junctions (*Connexine 40* und *43*) und Ionenkanäle (v.a. schnell leitende Natriumkanäle) sowie einen gut entwickelten Sarkomer-Apparat und eine hohe Anzahl an Sarkoplasmatischen Reticula (Moorman et al., 2000). Diese Eigenschaften ermöglichen die rasche, kraftvolle Kontraktion von Vor- und Hauptkammern während der Systole (Canale und Campbell, 1986).

Die Hauptkomponenten des reifen Erregungsleitungssystems spiegeln im Wesentlichen die Eigenschaften des primären Myokards, hohe Automtizität, geringe Leitungsfähigkeit und Kontraktilität, wider. Lediglich Atrioventrikulärbündel, Bündelverzweigungen und Purkinjefasern weisen abweichend davon eine hohe Leitungsgeschwindigkeit auf (reviewed in Moorman und Christoffels, 2003; Miquerol et al., 2004; reviewed in Bakker et al., 2010a; Zhang et al., 2011a).

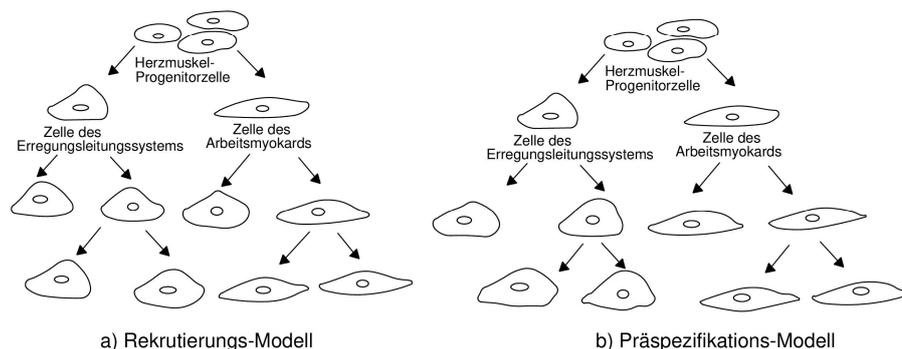
Primäres Myokard und Arbeitsmyokard unterscheiden sich nicht nur histomorphologisch, sondern auch durch frühzeitig divergierende Genexpressionsmuster (s. Kapitel 3.3). So exprimiert ersteres u.a. die Transkriptionsfaktoren *Tbx2* und *Tbx3*, welche die Differenzierung in Arbeitsmyokard unterdrücken. Letzteres ist gekennzeichnet durch *ANF*- sowie *Connexin40*- und *Connexin43*-Expression, die auch die Purkinjezellen umfasst (Chien et al., 1991; Moorman et al., 1998; Christoffels et al., 2000b; Yamada et al., 2000; Habets et al., 2002).

Der Mechanismus der Diversifikation primären Myokards in Zellen des Arbeitsmyokards auf der einen und Zellen des Erregungsleitungssystems auf der anderen Seite wird auf Grundlage zweier unterschiedlicher Sichtweisen kontrovers diskutiert:

(1) Im Rekrutierungs-Modell entwickelt sich ein Kardiomyozyten-Vorläufer entweder in eine Zelle des Arbeitsmyokards oder in eine Zelle des Erregungsleitungssystems im Sinne einer progressiven, lokalen Rekrutierung. Zellen des Arbeitsmyokards behalten jedoch die Fähigkeit, in Zellen des Erregungsleitungssystems zu (trans-) differenzieren und tragen durch fortlaufende Rekrutierung zum Wachstum desselben bei (Cheng et al., 1999; Pennisi et al., 2002; Gourdie et al., 2003).

Dieses Modell impliziert eine späte Determinierung, de-novo-Bildung und mangelnde Proliferationsfähigkeit des Erregungsleitungssystems.

(2) Das Präspezifikations-Modell geht von einer frühzeitigen (zu Beginn der Entstehung von ventrikulärem und atrialem Myokard, „Ballooning“) Festlegung der Vorläuferzellen auf ein Arbeitsmyokard- oder Erregungsleitungssystem-Schicksal aus. Die beiden unterschiedlichen Linien bleiben danach strikt getrennt voneinander (Moorman et al., 1998; Moorman und Christoffels, 2003) (siehe Abb.68).



**Abb.68:** Modelle der Diversifikation der Kardiomyozyten in Arbeitsmyokard und Zellen des Erregungsleitungssystems; links: Rekrutierungs-Modell; rechts: Präspezifikations-Modell, Erläuterung im Text, modifiziert nach Rosenthal und Harvey, 2010, S.187, Fig.6A/B

Unwiderlegbare Nachweise für die Transdifferenzierung von Arbeitsmyokard in Myokard des Erregungsleitungssystem vice versa fehlen bislang. Dahingegen scheint lediglich dem primären Myokard die Fähigkeit gegeben, in die zwei unterschiedlichen Myokard-Subtypen zu differenzieren, was dem Präspezifikationsmodell entspricht (Moorman et al., 1998; Cheng et al., 1999; Sedmera et al., 2003; Soufan et al., 2006; Rosenthal und Harvey, 2010).

### 3.7.2.2 Induktion des kardialen Erregungsleitungssystems

Die Zellen des Erregungsleitungssystems entwickeln sich in enger Nachbarschaft zum Endokard, einem lokalen Produzenten von *Endothelin-1* (Kanzawa et al., 2002; Sedmera et al., 2008). Dieses Peptidhormon induziert die Expression von Markern des Erregungsleitungssystems und die Differenzierung von Kardiomyozyten-Progenitor-Zellen in erregungsleitende bzw. Schrittmacherzellen bei Huhn und Maus. Deshalb wird *Endothelin-1* als wichtigster

Kandidat induktiver Signale der Diversifikation der Kardiomyozyten in Richtung Erregungsleitungssystem diskutiert (Gourdie et al., 1998; Gassanov et al., 2004; Zhang et al., 2012b).

Über unbekannte Mechanismen beeinflusst *Endothelin-1* die Frequenz spontaner Kalziumoszillationen an der Zellmembran embryonaler Kardiomyozyten und fördert die Expression Schrittmacher-typischer Gene wie *Tbx3*-, *HCN4*- und *Cx45* (Zhang et al., 2012b; Karppinen et al., 2014).

Bei der Maus ist auch der vom Endokard sezernierte Wachstumsfaktor *Neuregulin-1* unabhängig von *Endothelin-1* v.a. in den Ventrikeln, wo er für die Bildung des trabekulären Myokards unerlässlich ist, in die Induktion des Erregungsleitungssystems eingebunden (Rentschler et al., 2002; Patel und Kos, 2005; Hua et al., 2014).

Myokardiale *Notch*-Signale scheinen nicht nur in die Musterbildung und Begrenzung der Ausdehnung des Erregungsleitungssystems, sondern durch Heraufregulation spezifischer Marker ebenfalls direkt in seine Induktion involviert zu sein (Rentschler et al., 2012).

### 3.7.3 Entstehung des Sinusknotens

#### 3.7.3.1 Schrittmacheraktivität im primären Herzschlauch

Automatizität ist ein Charakteristikum aller Zellen des primitiven Herzschlauchs. Bereits vor den ersten Kontraktionen können Aktionspotentiale in den kürzlich differenzierten Kardiomyozyten des geraden Herzschlauchs registriert werden, die kurz darauf vorerst unregelmäßig und ungerichtet kontrahieren (Van Mierop, 1967; Kamino et al., 1981).

Mit dem Einsetzen gerichteter peristaltischer Kontraktionen ab HH14 beim Hühnerembryo diktieren die Myozyten des kaudalen Herzpols die Frequenz, da sie den schnellsten Zyklus elektrischer Aktivität generieren. Dies gilt auch für nachfolgend zum venösen Pol hinzugefügtes Gewebe, wie zukünftiges atriales Myokard und Sinus venosus-Myokard (Van Mierop, 1967; Patten, 1949).

Die Ursache dieses Phänomens liegt vermutlich im Expressionsmuster von *HCN4* (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated cation channel*). Dieses Gen codiert einen spannungsabhängigen Kanal, den sogenannten *funny-channel*, der eine Schlüsselrolle in der Ausübung der Schrittmacher-Aktivität in Kardiomyozyten einnimmt (Brown et al., 1979; Shi et al., 1999; Yasui et al., 2001; Marionneau et al., 2005).

*HCN4* wird bereits im kardiogenen Mesoderm exprimiert und später im Herzschlauch mit abnehmendem Gradienten vom venösen zum arteriellen Pol (Liang et al., 2013). Nach dem Looping geht seine Expression im Arbeitsmyokard von Atrien und Ventrikeln verloren, bleibt aber stark in Regionen zukünftiger Schrittmacherzentren (Sinus venosus und Atrioventrikularkanal) (Sizarov et al., 2011; Liang et al., 2013).

Bei E8.5 findet sich bei der Maus vorübergehend dominante Schrittmacheraktivität im linken Einflusstrakt. Die weitere Entwicklung kennzeichnet dann eine Verschiebung bzw. progrediente Beschränkung der Schrittmacheraktivität auf den neu gebildeten Sinusknoten im zukünftigen rechten Atrium bis E12.5 (Yi et al., 2012; Bressan et al., 2013).

#### 3.7.3.2 Morphogenese des Sinusknotens und ihre Regulation

Der Sinusknoten befindet sich im reifen Herzen am Eintrittsbereich der Vena cava cranialis ins rechte Atrium. Bei der Maus ist er kommaförmig mit der Verdickung („Kopf“) am Übergang zwischen Vena cava cranialis und rechtem Atrium und einem entlang der Crista terminalis (Überrest der embryonalen rechten Venenklappe) verlaufenden „Schwanz“ (Liu et al., 2007b).

In einer Subdomäne des Sinus venosus, dessen Myokard sich aus dem *Tbx18*-, *Isl1*-, *Podoplanin*-, *Tbx5*-, *HCN4*-, *Shox2*-positiven und *Nkx2.5*-negativen kaudalen Zweiten Herzfeld (auch Drittes Herzfeld genannt) rekrutiert, entsteht bei der Maus ab E9-9.5 via Proliferation einer Subpopulation *Tbx3*-exprimierender Zellen das Primordium des Sinusknotens (Mommersteeg et al., 2010; Christoffels et al., 2006; Cai et al., 2003; Groot et al., 2007; Moskowitz et al., 2004; Vicente-Steijn et al., 2010 und 2011; Blaschke et al., 2007; Bressan et al., 2013).

Der von *Retinsäure* regulierte, in einem kaudokranialen Gradienten exprimierte Transkriptionsfaktor *Tbx5* steht in der transkriptionalen Regulation der Entstehung des Sinusknotens an oberster Stelle (Niederreither et al., 2001; Bruneau et al., 2001b; Guo et al., 2016). Er kontrolliert die Expression des Transkriptionsfaktors *Shox2*, der gemeinsam mit *Tbx3* eine Schlüsselposition in diesem Prozess einnimmt (Puskaric et al., 2010). *Shox2* fördert die Expression von *Isl1*, der im Zusammenspiel mit *Tbx18* Rekrutierung und Proliferation mesenchymaler Vorläufer aus dem kaudalen Zweiten Herzfeld sowie die korrekte Morphogenese des Sinusknoten-Primordiums vermittelt (Christoffels et al., 2006; Wiese et al., 2009; Hoffmann et al., 2013).

Von wesentlicher Bedeutung ist jedoch die direkte Repression von *Nkx2.5* durch *Shox2* (Espinoza-Lewis et al., 2009). Dadurch wird in der *Shox2*-Expressionsdomäne die Etablierung des Geno- und Phänotyps atrialen Arbeitsmyokards als Voraussetzung für die Schrittmacherfähigkeit verhindert (Mommersteeg et al., 2007b). Gleichzeitig wird dadurch die Expression von *HCN4* und *Tbx3* indirekt gefördert (Espinoza-Lewis et al., 2011).

Mit dem Voranschreiten der Ummodellierungsvorgänge am venösen Pol (Rechtsverlagerung der systemischen venösen Zuflüsse, Etablierung der Atrien, siehe Abschnitt 3.5) beginnt sich in der linken sinuatrialen Region durch *Pitx2C*-medierte Suppression von *Shox2* und *HCN4* das Genprogramm atrialen Arbeitsmyokards unter Expression von *Nkx2.5*, *ANF*, *Cx40* und *Cx43* zu vollziehen (Mommersteeg et al., 2007b; Wang et al., 2010). Etwa zum selben Zeitpunkt (E9.5) manifestiert sich unter dem fördernden Einfluss von *Shox2* im prospektiven Sinusknoten-Areal die Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx3*, eines „Master-Regulators“ des zentralen Erregungsleitungssystems (i.e. Sinusknoten, Atrioventrikularknoten, Atrioventrikulärbündel und dessen Verzweigungen). *Tbx3* spezifiziert die Sinusknoten-Progenitoren, kontrolliert maßgeblich das Genprogramm (u.a. *HCN4* und *Cx45*) des Sinusknotens und ist somit verantwortlich für dessen Differenzierung und Schrittmacherfunktion (Hoogaars et al., 2004; Hoogaars et al., 2007; Mommersteeg et al., 2007b; Wiese et al., 2009; Zhang et al., 2012b) (siehe Abb.58, S. 112).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung der sinuatrialen Region demarkiert sich das Atrienmyokard sowohl genetisch via *Nkx2.5*-Expression als auch morphologisch von der Sinus venosus-Region. Die Expressionsdomänen von Schrittmacher-spezifischen Genen (*HCN4*, *Shox2*, *Tbx3*) ziehen sich zurück auf den entstehenden Sinusknoten. Die Überreste des originären Sinus venosus-Myokards (Sinushörner, myokardiale Umhüllung der Kavalvenen) akquirieren abgesehen vom Sinusknoten ab E14.5 einen Arbeitsmyokard-Charakter (Mommersteeg et al., 2007b).

Spezialisierte (Expression von *HCN4*, *Tbx3*) internodale (zwischen Sinus- und Atrioventrikularknoten gelegener) Stränge im Bereich der Derivate der embryonalen Venenklappen scheinen als Haupt-Leitungsweg zwischen den Knoten zu fungieren (Hoogaars et al., 2004; Yi et al., 2012). Das übrige atriale Myokard besteht aus dünnwandigen und dickwandigen Komponenten. Letztere exprimieren in hohem Maße *Cx40* sowie den rasch leitenden Natriumkanal *Scn5a*, was sie zu bevorzugten Leitungsbahnen der elektrischen Erregung über das atriale Myokard macht (Bressan et al., 2014).

### 3.7.3.3 Aufbau des Sinusknotens

Die prinzipielle Morphologie des Sinusknotens ist innerhalb des Stammes der Säugetiere konserviert (Bleeker et al., 1980; Joyner und Van Capelle, 1986; Denyer und Brown, 1990; Van Ginneken und Giles, 1991; Anumonwo et al., 1992; Mitsuiye et al., 1999; Ono et al., 2000; Cho et al., 2003; Mangoni et al., 2001).

Er besteht aus Schrittmacherzellen, Fibroblasten, Adipozyten und atrialen Kardiomyozyten (Cho et al., 2003). In der Kernregion dominieren Zellen mit geringer und hoher Schrittmacheraktivität, zur Peripherie hin steigt der Gehalt an atrialen Kardiomyozyten an (Verheijck et al., 1998). Die morphologische Heterogenität geht einher mit sich vom Zentrum zur Peripherie hin ändernden elektrophysiologischen Eigenschaften, die auf einer differentiellen Expression von Gap Junction-Proteinen (speziell: Connexine) und Ionenkanälen beruhen (Boyett et al., 2006; Dobrzynski et al., 2005; Kodama et al., 1997; Liu et al., 2007b).

Im Kern des Sinusknotens werden überwiegend für schwache Kopplung verantwortliche *Connexine45* und *30.2*, im Randbereich die hoch konduktiven *Connexine43* und *40* exprimiert, was in einem positiven Gradienten der Impulsleitungsgeschwindigkeit vom Zentrum zur Peripherie resultiert (Dobrzynski et al., 2005; Kreuzberg et al., 2005).

Die Position der führenden Schrittmacher-Aktivität im Sinusknoten ist nicht fixiert. Sie kann sich durch den Einfluss des autonomen Nervensystems, Temperaturänderungen, Dehnung der Atrien sowie Medikamente verschieben (Mackaay et al., 1980a,b; Boyett et al., 2000; Schuessler et al., 1996).

Interstitielle Fibroblasten sind nicht an der Erregungsleitung beteiligt, können sich aber durchaus mit den Myozyten des Sinusknotens verbinden und sind möglicherweise durch die Fähigkeit zur Transduktion von atrialen Dehnungsreizen an die Schrittmacherzellen an der mechanoelektrischen Regulation der Herzfrequenz beteiligt (Camelliti et al., 2004; Kohl et al., 1994).

### 3.7.3.4 Mechanismen der Schrittmacheraktivität

Die Mechanismen der Generierung intrinsischer Aktivität durch Schrittmacher-Kardiomyozyten sind äußerst komplex und entbehren derzeit noch ein konkretes und übereinstimmendes Konzept. Unstrittig hingegen ist, dass sie auf der Expression spezieller Ionenkanäle in der Zellmembran und dem intrazellulären Kalzium-Zyklus beruhen.

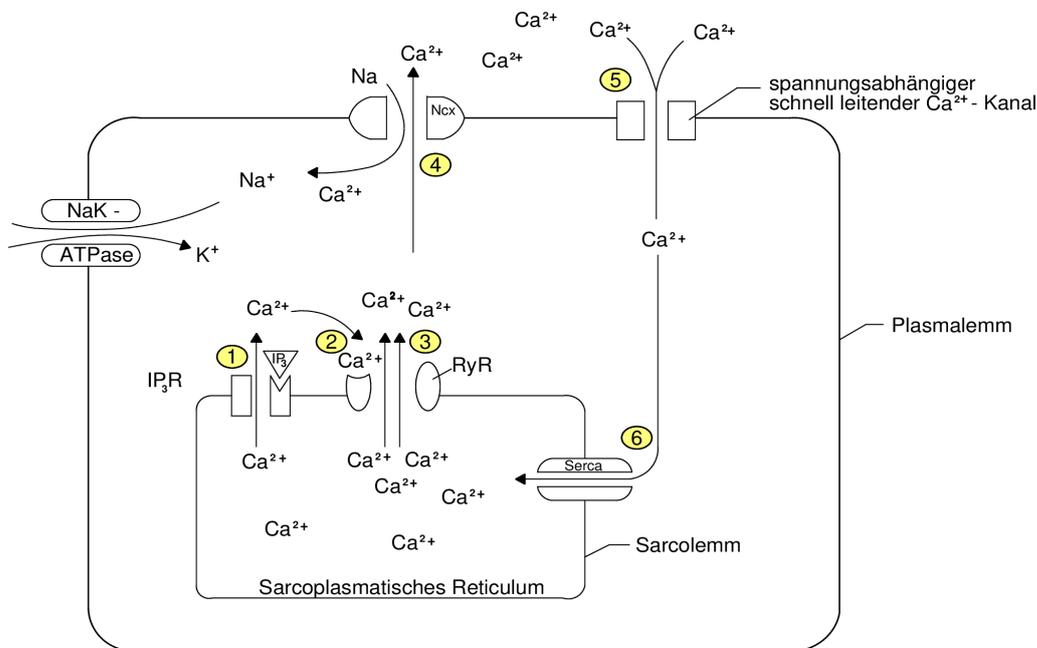
Für die Schrittmacherfunktion bedeutende Ionenkanäle sind:

- (1) HCN4- bzw. funny-Kanäle, auch als Schrittmacherkanäle bezeichnet, deren spannungsabhängiger, von Kationen (v.a. Natrium und Kalium) getragener Strom in die Zelle hinein für die initiale, schnelle Depolarisation verantwortlich ist (Di Francesco, 1981; Barbuti et al., 2007; Sizarov et al., 2011). *HCN4*-Kanäle werden in hohem Maße und dominant in Sinusknoten und Atrioventrikularknoten exprimiert (Yasui et al., 2001; Marionneau et al., 2005, Shi et al., 1999).
- (2) Spannungsabhängige Kalzium-Kanäle, die ebenfalls verstärkt in Sinusknoten und Atrioventrikularknoten exprimiert, durch die Depolarisation aktiviert, zum Kalzium-Einstrom in die Zelle führen, was eine Erhöhung der Depolarisations-Geschwindigkeit zur Folge hat (Hagiwara et al., 1988; Mangoni et al., 2006).
- (3) Spannungsabhängige Natrium-Kanäle, die v.a. bei Kaninchen und Maus im Sinusknoten vorkommend die Geschwindigkeit der späten Depolarisationsphase erhöhen (Kodama et al., 1997; Mangoni et al., 2001)
- (4) Spannungsabhängige Kalium-Kanäle. Sie regulieren die Repolarisationsphase im Sinne eines verzögerten Gleichrichtungsstroms sowohl in Schrittmacherzellen von Sinus- und Atrioventrikularknoten als auch im Arbeitsmyokard (Noma und Irisawa, 1975; Wang et al., 1996; Nerbonne und Kass, 2005; De la Rosa et al., 2013).

- (5) Natrium-Kalium-Pumpen, die im Sinusknoten via Natriumaus- und Kaliumeinschleusung zur Hyperpolarisation beitragen (Noma und Irisawa, 1975).
- (6) Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX). Sie tragen durch Kalzium-Austransport und Natrium-Einschleusung zur Repolarisation und zur Kalziumhomöostase in Schrittmacherzellen bei (Bogdanov et al., 2001; Sanders et al., 2006).

Darüberhinaus existieren Chlorid-, bislang nicht genauer charakterisierte St (sustained)-Kanäle und Protonenpumpen in Schrittmacherzellen (Mello, 1963; Cho et al., 2003; Guo und Noma, 1997; Shinagawa et al., 2000; Malo und Fliegel, 2006), deren konkrete Bedeutung für die intrinsische Aktivität unklar ist.

Der intrazelluläre Kalzium-Zyklus, auch interne „Kalzium-Uhr“ genannt, ist bereits vor der vollständigen Ausprägung der Schrittmacher-Ionenkanäle aktiv. Er beruht auf einer spontanen (getriggert durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter, z.B. Endothelin1) auf Phospholipase C-Aktivierung beruhenden Inositoltriphosphat-abhängigen Freisetzung von Kalzium-Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Reticulum intrinsisch aktiver Zellen in das Zytoplasma (s. Abb.69 (1)). Dieses Kalzium wiederum stimuliert die Kalzium-abhängigen Ryanodinrezeptoren des Sarkoplasmatischen Reticulums zu weiterer Freisetzung von Kalzium (s. Abb.69 (2+3)). Natrium-Kalzium-Austauscher in der Zellmembran befördern die Kalzium-Ionen aus der Zelle heraus, während Natrium-Ionen hineinströmen (s. Abb.69 (4)). Dadurch generierte Membran-Oszillationen (Schwankung der Spannung an der Zellmembran) aktivieren spannungsabhängige schnelle Kalziumkanäle, wodurch Kalzium wieder in die Zelle aufgenommen wird und ein Aktionspotential entsteht. Die dann sehr hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration bewirkt eine Hemmung der sarkolemmalen Kalziumfreisetzung durch Schließen der entsprechenden Kanäle *IP3R2* und *RyR*. Gleichzeitig wird Kalzium über die sarkolemmale Kalziumpumpe *SERCA* wieder in die Sarkoplasmatischen Retikula befördert als Voraussetzung für einen neuen Zyklus (s. Abb.69 (5)) (Bogdanov et al., 2001; Mery et al., 2005; Sanders et al., 2006; Lakatta et al., 2006; Sasse et al., 2007; Rapila et al., 2008; Ju et al., 2011; Yi et al., 2012; Karppinen et al., 2014; Vervloessem et al., 2015; Wescott et al., 2016).



**Abb.69:** Funktionsweise der „Kalzium-Uhr“, Ablauf entsprechend der Nummerierung 1-6, Erläuterungen siehe Text, NaK-ATPase: Natrium-Kalium-ATPase, IP3R: Inositoltriphosphat-Rezeptor, IP3: Inositoltriphosphat, RyR: Ryanodinrezeptor; eigene Darstellung

Die spannungsunabhängige intrazelluläre Kalzium-medierte Automatizität ist früh entwickelt und scheint der Haupt-Mechanismus für die frühzeitige, auf Grund der Diffusion der Kalzium-Ionen zur Zellmembran verhältnismäßig langsame Impulsgenerierung im linken Einflusstrakt ab E8.5 zu sein (Mery et al., 2005; Yi et al., 2012).

Mit der Etablierung der plasmalemalen Ionenkanäle im Sinusknotenprimordium verschiebt sich die Schrittmacherfunktion bis E12.5 dorthin und wird dann überwiegend durch die plasmalemalen Schrittmacher-Ionenkanäle reguliert, wenngleich Kopplung und Koordination mit dem basalen Kalzium-Zyklus vorhanden und notwendig sind. Der Kalzium-Kreislauf nimmt u.a. über die Wirkung von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern via Inositoltriphosphat-Produktion auch nach Etablierung der Schrittmacher-Ionenkanäle direkten Einfluss auf die Herzfrequenz (Mery et al., 2005; Lakatta et al., 2006; Rapila et al., 2008; Korhonen et al., 2009; Karppinen et al., 2014).

Über die detaillierte Funktionsweise der Automatizität herrscht auf Grund der Vielfalt und komplexen Interaktion der Ionenkanäle noch keine Klarheit.

Prinzipiell ist vermutlich für den Aufbau des maximalen diastolischen Potentials und die Repolarisation, equivalent zu anderen erregbaren Membranen, der Kaliumausstrom durch Kaliumkanäle, wie er in Sinusknotenzellen bei Kaninchen und Schweinen nachgewiesen wurde, verantwortlich (Ono und Ito, 1995; Verheijck et al., 1995; Ono et al., 2000).

Eine im Vergleich zu Arbeitsmyokard-Zellen *Tbx3*-vermittelte, reduzierte Anzahl an einwärtsgerichteten diastolischen Kaliumströmen ermöglicht das Erreichen eines höheren diastolischen Potentials mit nachfolgender spontaner Depolarisation (Bakker et al., 2012). Durch Hyperpolarisation aktivierte *HCN4*-Kanäle initiieren die rasche Depolarisation, bevor schnelle Kalziumkanäle ihren Schwellenwert erreichen und die Depolarisation vorantreiben. Beide Ionenkanäle ermöglichen einen schnellen Schrittmacherrhythmus (Yi et al., 2012).

Schnelle Natriumkanäle sind für die intrinsische Aktivität nicht von Bedeutung, spielen aber eine tragende Rolle für die schnelle Weiterleitung der Erregung zum und über das Arbeitsmyokard. Sie sind demnach auch eher in den peripheren Zonen von Sinus- und Atrioventrikularknoten sowie v.a. im Arbeitsmyokard zu finden (Yi et al., 2012).

### 3.7.4 Entwicklung des Atrioventrikularknotens

#### 3.7.4.1 Morphogenese und transkriptionales Profil

Durch sein Potential zur Impulsgenerierung steht der Atrioventrikularknoten nach dem Sinusknoten an zweiter Stelle in der Hierarchie des kardialen Erregungsleitungssystems. Seine Hauptaufgabe besteht in der verzögerten Weiterleitung des Impulses von den Atrien in die Ventrikel, nachdem letztere ab E13.5 durch eine fibröse Schicht elektrisch voneinander isoliert sind (Tallini et al., 2006).

Er befindet sich in der kaudalen Wand des rechten Atriums zwischen dem Ostium des Koronarsinus, dem atrialen Septum und der Ansatzstelle des septalen Trikuspidalklappenblatts (Kozłowski et al., 1998). Ähnlich dem Sinusknoten ist der Atrioventrikularknoten eine sehr heterogene Struktur mit einem kompakten Kern, umgeben von transitionalem Gewebe sowie kleinen Verlängerungen („nodal extensions“, ausgehend von den atrioventrikulären Ringbündeln, s.u.) vorwiegend im Bereich der Trikuspidalklappenbasis (Ko et al., 2004; Li et al., 2008; Yanni et al., 2009).

Dem Vogel fehlt ein morphologisch definierbarer Atrioventrikularknoten. Stattdessen scheint ein die rechte Atrioventrikularklappe umgebender Ring aus Purkinjefaser-artigem Gewebe seine Funktion zu erfüllen (Szabo et al., 1986).

Der dem Ersten und Zweiten Herzfeld entstammende embryonale Atrioventrikularkanal bildet die zelluläre und transkriptionale Grundlage zur Entstehung des Atrioventrikularknotens (Viragh und Challice, 1977; Davis et al., 2001; Aanhaanen et al., 2009; Miquerol et al., 2013).

Während der Kammerexpansion behält der Atrioventrikularkanal seinen primitiven Phänotyp durch *BMP2*-induzierte Expression von *Tbx2*, einem Repressor des Arbeitsmyokard-Genprogramms, bei (Yamada et al., 2000; Ma et al., 2005; Aanhaanen et al., 2009, 2011).

Die langsame Erregungsleitung beruht auf der Expression von *Connexin 45* und *Connexin 30.2* (nur Maus), die Gap Junctions mit schwacher Leitfähigkeit bilden (Aanhaanen et al., 2011; Kreuzberg et al., 2006).

*Tbx5* reguliert in Kooperation mit *GATA4* sowohl die *Connexin30.2*-Expression im Atrioventrikularkanal, als auch die Expression von *Tbx3*, der, wie im Sinusknoten, das genetische Programm (u.a. *HCN4*, *Connexin 45*) und damit die Funktion des Atrioventrikularknotens kontrolliert (Mori et al., 2006; Munshi et al., 2009).

Von den Transkriptionsfaktoren *Hey1/2*-vermittelte, *BMP2*- und *Tbx2/3*-hemmende *Notch*-Signale sowie *Tbx20* im Arbeitsmyokard definieren die Grenze zwischen Atrioventrikularkanal und angrenzendem atrialen/ventrikulären Arbeitsmyokard (Rutenberg et al., 2006; Singh et al., 2009, 2012; Cai et al., 2011; Rentschler et al., 2011, 2012).

Primordialzellen des Atrioventrikularknotens sind ab E9.5, kurz nach Beginn der Differenzierung des Arbeitsmyokards, an der inneren Schicht des dorsalen Atrioventrikularkanal, nachweisbar (Viragh und Challice, 1982, 1977).

Mittels Proliferation gewinnt diese primordiale Struktur ab E11 an Größe, während das übrige Atrioventrikularkanal-Myokard verschwindet (Erokhina und Rumyantsev, 1988; Aanhaanen et al., 2009). Der überwiegende Teil dieses Myokards wird unter Differenzierung in Arbeitsmyokard in den linken Ventrikel inkorporiert. Ein geringerer Teil unterliegt wahrscheinlich apoptotischen Vorgängen (Viragh und Challice, 1977; Aanhaanen et al., 2009; reviewed in Aanhaanen et al., 2010).

Gleichzeitig beschränken sich die Expressionsdomänen der Marker des Erregungsleitungssystems zunehmend auf den definitiven Atrioventrikularknoten sowie rechte und linke atrioventrikuläre Ringbündel. Die Ringbündel umgeben in Kontinuität mit dem Atrioventrikularknoten als Überbleibsel ursprünglichen Atrioventrikularkanal-Myokards die Vestibula der Mitral- und Tricuspidalklappe und können unter pathologischen Bedingungen als ektopische Schrittmacher fungieren (Hoogaars et al., 2004; Aanhaanen et al., 2009).

Das auf dem Kamm des Ventrikelseptums gelegene und in Verbindung mit dem Atrioventrikularknoten stehende Atrioventrikularbündel bildet neben dem Erstgenannten das zweite essentielle Element der sogenannten atrioventrikulären Erregungsleitungsachse. Auf Grund abweichender Herkunft und genetischen Designs wird es dem ventrikulären Erregungsleitungssystem zugeordnet und dort besprochen.

#### 3.7.4.2 Entstehung und Bedeutung der Atrioventrikulären Isolation

Im reifen Herz sind die atrialen und ventrikulären Kompartimente durch eine fibröse Schicht elektrisch voneinander isoliert. Die sogenannte atrioventrikuläre Erregungsleitungsachse, bestehend aus Atrioventrikularknoten und Atrioventrikularbündel, stellt die einzige myokardiale Verbindung zwischen ihnen her (Oosthoek et al., 1998; Bakker et al., 2008).

Ab etwa E11 beginnen „epicardium-derived cells“ aus dem atrioventrikulären Sulcus von der epikardialen Seite her und Mesenchymzellen aus den Endokardkissen das z.T. der Apoptose unterliegende Myokard des Atrioventrikularkanal zu durchdringen (Wessels et al., 1996; Oosthoek et al., 1998). Nach Fusion der beiden Zellpopulationen differenzieren sie sich in überwiegend Kollagen-produzierende Fibroblasten (Kolditz et al., 2008; Lie-Venema et al., 2008; Zhou et al., 2010).

Die molekulare Grundlage dieses Prozesses ist kaum untersucht und durch die enge Verquickung mit der Entwicklung der Atrioventrikularklappen und des Atrioventrikularknotens schwierig von diesen separat zu eruieren.

*BMP2* ist ein wesentlicher Faktor, der sowohl in die Anulusfibrose als auch in die Valvulogenese und die Etablierung des Atrioventrikularknotens eingebunden ist (Gaussin et al., 2005; Okagawa et al., 2007). Produziert vom Myokard des Atrioventrikularkanal stimuliert *BMP2* die „epicardium-derived cells“ zur Produktion des extrazellulären Matrix-Moleküls *Periostin*, das seinerseits die Fibrosierung via Regulation der Kollagen1-Fibrillogenese fördert (Norris et al., 2007; Zhou et al., 2010). Die fibröse Isolation erfolgt graduell und ist erst in späten fetalen Entwicklungsstadien abgeschlossen (Kolditz et al., 2007, 2008).

Störungen in der Entwicklung des Atrioventrikularkanal oder der „epicardium-derived cells“ führen zur Präsenz abnormaler zusätzlicher myokardialer Bündel (accessory pathways) zwischen Atrien und Ventrikeln, die atrioventrikuläre Reentry-Tachykardien hervorrufen können (Anderson et al., 1996; Kolditz et al., 2007; Aanhaanen et al., 2011).

### 3.7.5 Etablierung des ventrikulären Erregungsleitungssystems

#### 3.7.5.1 Allgemeines zu Aufbau, Eigenschaften und Herkunft

Die ventrikulären Komponenten des kardialen Reizleitungssystems, namentlich Atrioventrikulärbündel, rechte und linke Bündelverzweigungen und das komplexe Purkinjefasernetzwerk gewährleisten durch die Expression von *Connexin 40* und eines schnell leitenden Natriumkanals (kodiert vom Gen *Scn5a*) die rasche Weiterleitung des elektrischen Impulses aus dem Atrioventrikularknoten und seine schnelle Ausbreitung über das Ventrikulamyokard (Viragh und Challice, 1977 und 1982; Miquerol et al., 2004; Zhang et al., 2011a). Ihre Reifung geht einher mit der Umstellung auf das endgültige Apex-zu-Basis-Aktivierungsmuster von E10.5 bis E12.5, noch bevor die Septierung der Ventrikel abgeschlossen ist (Rentschler et al., 2001; Reckova et al., 2003). Das Potential des ventrikulären Erregungsleitungssystems zur Generierung von Schrittmacheraktivität ist schwächer ausgeprägt als bei Sinus- und Atrioventrikularknoten (Anumonwo et al., 2001).

Alle Elemente des ventrikulären Erregungsleitungssystems entstehen aus dem *Connexin 40*-positiven trabekulären Myokard der Ventrikel direkt unterhalb des Endokards (Miquerol et al., 2010; reviewed in Aanhaanen et al., 2010). Die Progenitoren rekrutieren sich sowohl aus dem Ersten (linke Bündelverzweigungen und linksventrikuläre Purkinjefasern) als auch aus dem Zweiten Herzfeld (rechtsventrikuläre Purkinjefasern) bzw. anteilig aus beiden (Atrioventrikulärbündel und rechte Bündelverzweigungen) (Miquerol et al., 2013).

Das schwammartige trabekuläre Myokard entsteht ab E9 auf der luminalen Seite der Ventrikel und ist eine Art primitives, ontogenetisch „altes“ Ventrikulamyokard, das durch schwache Proliferation des primären Myokards an den Ventrikelregionen hervorgegangen ist. Ein schwach ausgeprägter kontraktiler Apparat charakterisiert seine primitiven Eigenschaften (Canale et al., 1986). Ein hoher Gehalt an *Connexin 40* erklärt die vorzugsweise Leitung des elektrischen Impulses durch das trabekuläre Myokard zum Kompaktmyokard (Van Kempen et al., 1996; Chuck et al., 1997).

Es wird nachfolgend ab E11.5 durch das an der epikardialen Seite stark proliferierende Kompaktmyokard (Arbeitsmyokard im engeren Sinne) auf eine relativ schmale lumenseitige Region begrenzt (Canale et al., 1986; Meilhac et al., 2003; Costantini et al., 2005). Der durch sogenannte „*Pocket Proteine*“\* regulierte transmurale Proliferationsgradient ist essentiell für die korrekte Entwicklung des ventrikulären Erregungsleitungssystems (Park et al., 2013).

Die ontogenetisch „alten“ Zellen der Trabekel bilden den Zellpool für das ventrikuläre Erregungsleitungssystem, das ab E10.5 durch progressive Stammlinienrestriktion und nachfolgende Proliferation aus gemeinsamen Vorläufern mit dem Arbeitsmyokard hervorgeht (Miquerol et al., 2010). Erst postnatal transformiert die verbliebene schmale Trabekelschicht der freien Wände der Ventrikel in das letztlich nur ein bis zwei Zellschichten dünne Purkinjefasernetzwerk (Miquerol et al., 2004; Meysen et al., 2007).

**Pocket Proteine:**  
Familie von Proteinen, die in die Endstufe der Zellzyklus-Regulationskaskade eingebunden sind

### 3.7.5.2 Morphogenese und Regulation des ventrikulären Erregungsleitungssystems

Das Atrioventrikularbündel entsteht ab E9.5 aus dem Kamm des Ventrikelseptums, der von Beginn an in Verbindung mit dem Atrioventrikularkanal und späteren Atrioventrikularknoten steht. Nach der vollständigen elektrischen Isolation des atrialen vom ventrikulären Myokard durch den Anulus fibrosus ist er die einzige myokardiale Verbindung zwischen Atrioventrikularknoten und ventrikulärem Reizleitungssystem (Viragh und Challice, 1977; 1982).

Mit fortschreitender Entwicklung des Ventrikelseptums, das aus Trabekelmyokard entsteht, etablieren sich rechts und links unterhalb des Atrioventrikularbündels die sich gabelnden Bündelverzweigungen.

Frühe *Tbx3*-Expression in Atrioventrikularbündel und proximalen Bündelverzweigungen hemmt die Expression von *ANF* und *Connexin40*, Genen, die erst ab E14.5, wenn die Isolation zwischen Atrien- und Ventrikelmyokard abgeschlossen ist, angeschaltet werden (Bakker et al., 2008). Davor erfolgt die Reizleitung über das verbleibende trabekuläre Verbindungsmyokard.

Ab E14 aktiviert *Irx3* in den Kardiomyozyten des gesamten ventrikulären Erregungsleitungssystems die *Cx40*-Expression als Voraussetzung für hohe Leitungsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Hemmung von *Cx43*, dem Connexin des Arbeitsmyokards (Zhang et al., 2011b).

*Tbx5* und *Nkx2.5* aktivieren kooperativ die Expression von *Id2* (*Inhibitor of differentiation*), ein für die Entwicklung des Atrioventrikularbündels essentieller transkriptionaler Repressor (Moskowitz et al., 2007).

Die Purkinjefasern umschreiben das komplexe Netzwerk der terminalen Fasern aus den septalen Bündelverzweigungen in den freien Wänden der Ventrikel (Miquerol et al., 2004). Sie verbreiten den elektrischen Impuls rasch im Arbeitsmyokard, wodurch dieses effektiv und die Ventrikel synchron aktiviert werden (Saikawa und Carmeliet, 1982).

Ihr transkriptionales Profil entspricht, bis auf fehlende *Tbx3*-Expression, dem der proximalen Komponenten (Hoogaars et al., 2004; Bakker et al., 2008; Zhang et al., 2011).

Die Abbildung 70 gibt einen abschließenden Überblick über regulatorisch essentielle Transkriptionsfaktoren der unterschiedlichen Komponenten des Erregungsleitungssystems:

	Sinus-Knoten	AV-Knoten	AV-Bündel	Bündel-Verzweigungen	Purkinjefasern
Tbx2	-	+	-	+	-
Tbx3	+	+	+	+	-
Cx40/43	-	-	+	+	+
Cx30.2/45	+	+	-	-	-
Id2	-	-	+	+	+
Nkx2.5	-	+	+	+	+

**Abb.70:** Transkriptionales Profil der Komponenten des kardialen Impulsgenerierungs- und Weiterleitungssystems, modifiziert nach Rosenthal und Harvey, Table 1, S. 174

*Endothelin-1* und *Neuregulin-1* fördern die Differenzierung der Purkinjefasern möglicherweise via Aktivierung von *Nkx2.5*, der die postnatale Reifung mediiert (Gourdie et al., 1998; Rentschler et al., 2002; Meysen et al., 2007).

Bei der Maus ist *Endothelin-1* jedoch für die Entwicklung der Purkinjefasern entbehrlich (Hua et al., 2014).

Eine Besonderheit beim Huhn ist die Existenz periarterieller Purkinjefasern um die Koronararterien herum, die vermutlich durch lokale endotheliale *Endothelin-1*-Signale induziert werden, deren Bedeutung aber unerforscht ist (Gourdie et al., 1998; Takebayashi-Suzuki et al., 2000).

## 4. Diskussion

### 4.1 Bedeutung der Kardiogenese und Zielsetzung

Mit dem Aufkommen moderner molekularbiologischer und technischer Untersuchungsmethoden vernetzte sich die Kardiologie mit Genetik, Molekular- und Entwicklungsbiologie auf dem Feld der Erforschung der Kardiogenese. Das detaillierte Wissen über die morphogenetischen Ereignisse und ihnen zugrunde liegende genetische und molekulare Regulationsmechanismen macht es möglich, singuläre oder in Syndromen auftretende Herzerkrankungen zu verstehen und eröffnet Möglichkeiten der Vorbeugung und Therapie. Angeborene und erworbene Erkrankungen des Herzens gehören zu den am häufigsten auftretenden Leiden in den Industrienationen bei Mensch und Tier (Kemler und Martin, 1972; Cottrill und Rossdale, 1992; Ohad et al., 2013; Van der Linde et al., 2011; Roger et al., 2012; Häggström et al., 2015; Scansen et al., 2015; Schrope, 2015).

In der jüngeren Vergangenheit ist es bereits gelungen, kardiomyogenes Potential nicht nur in embryonalen Stammzellen und endogenen Stammzellen aus dem Herz- oder Fettgewebe adulter Individuen zu aktivieren, sondern auch über den Umweg der Reprogrammierung von Fibroblasten oder Zellen der Amnionflüssigkeit Stammzellen mit kardiogenem Potential zu generieren und sie erfolgreich zur Regeneration von Myokardinfarkten einzusetzen (Linke et al., 2005; Takahashi et al., 2007; Murry und Keller, 2008; Zhao et al., 2015; Jiang et al., 2016; Xu et al., 2016; Wystrychowski et al., 2016). Gleichmaßen ist die Wissenschaft bemüht um Erkenntnisse über endo- und exogene Einflussfaktoren auf die Herzentwicklung, um in Zukunft kongenitale Herzerkrankungen zu verhindern (Normand et al., 1991; Lambrechts und Carmeliet, 2004; Wei et al., 2013, 2016; Lei et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit war es, die gegenwärtigen, aktuellen Erkenntnisse der Kardiogenese zusammenzutragen und in einem übersichtlichen und verständlichen Kontext darzustellen. Ein wichtiges Anliegen war es auch, auf veraltete Anschauungen, die noch immer v.a. in Lehrbüchern vertreten sind, hinzuweisen und aktuelle Konzepte darzulegen. Neuere Auflagen der etablierten Lehrbücher der Veterinär-Embryologie berücksichtigen aktuelle Ergebnisse, jedoch nur jene über die molekulare Regulation, entweder in Form von angehängten Textfeldern („Box“) am Ende des Kapitels oder als eingestreute Informationen im laufenden Text. Wünschenswert wäre es, in Lehrbüchern ein auf neuestem Fachwissen basierendes Gesamtkonzept der Kardiogenese zu erarbeiten, das Morphogenese und Regulation schlüssig integriert, um sich endgültig unzeitgemäßer Vorstellungen zu entledigen. Andererseits ist es kaum möglich, die komplexen neuen Erkenntnisse zur Kardiogenese simpel in einem Lehrbuch für Studenten darzulegen. Daher besitzen die tradierten Schriften nach wie vor ihre Berechtigung.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, Themenfelder aufzuzeigen, die noch dem wissenschaftlichen Disput unterworfen sind und wichtige Ansätze für weitergehende Forschungsarbeit liefern.

## 4.2 Material, Methoden und Limitationen

Den in dieser Arbeit ausgewerteten Studien liegen zum Großteil Experimente an Mäuse- und Hühnerembryonen bzw. deren Zellen zugrunde. Embryonen und Zellen von Mensch, Kaninchen, Ratte und anderen Spezies spielen eine untergeordnete Rolle.

Die bei der Untersuchung verschiedener Spezies herausgefilterten Gemeinsamkeiten dienen häufig der Extrapolation auf andere Spezies wie v.a. den Menschen und der Aufdeckung gemeinsamer Entwicklungsmechanismen (Bruneau, 2008; Rashidi und Sottile, 2006).

Diese evolutionäre, zumeist anthropozentrische Sichtweise birgt jedoch Fallstricke. Evolution bedeutet keineswegs die Entwicklung in Richtung höherer Komplexität durch Selektion (Xavier et al., 2007). Diese Ansicht ist aber gerade in Bezug auf die Kardiogenese allzu reizvoll (man fühlt sich gar an Häckels Rekapitulationstheorie erinnert). In der jüngeren Vergangenheit hat sich herausgestellt, dass insbesondere Rückschlüsse von konservierten regulatorischen Netzwerken auf morphogenetische Homologie (Übereinstimmung auf Grund eines gemeinsamen Ursprungs) sehr kritisch zu bewerten sind (Xavier et al., 2007). Dies trifft natürlich umso mehr zu, je weiter wir uns entwicklungsgeschichtlich im tierischen Stammbaum zurückbewegen und verdeutlicht sich in Anbetracht dessen, dass beispielsweise Mollusken (!) wie die höheren Vertebraten, über ein mehrkammeriges Herz verfügen, ein Umstand, der sich nur durch konvergente Evolution erklären lässt (Xavier et al., 2007). So lautet der Konsens derzeit, dass die vaskulären „Pumporgane“ aller Tiere als parallele, an die jeweiligen Lebensbedingungen angepasste Weiterentwicklungen einer ursprünglichen, peristaltischen Pumpe des gemeinsamen Protostomia-Deuterostomia-Urahns entstanden sind. Entsprechende morphologische Analogien (Ähnlichkeiten im Aufbau), wie z.B. zwischen dem Dorsalgefäß der Taufliede und dem geraden Herzschlauch des Vertebraten-Embryos sind „zufälliges“ Resultat ähnlicher i.w.S. äußerer Bedingungen (Xavier et al., 2007; Harvey und Rosenthal., 2010). Erwiesen und anerkannt hingegen ist ein gemeinsamer Ursprung genetischer Regulationsnetzwerke (jedoch nur!) auf der Ebene von bestimmten Zellarten bzw. Geweben. Orthologe Gene (d.h. homologe Gene in verschiedenen Spezies) und assoziierte Netzwerke, die beispielsweise die Differenzierung von (Kardio-)Myozyten steuern, lassen sich von Taufliede, Schlauchaszie, Zebrafisch, Krallenfrosch bis hin zu Huhn, Maus und Mensch nachweisen (Bodmer, 1995; Lyons et al., 1995; Fu et al., 1998; Zaffran und Frasch, 2002; Holland et al., 2003; Shimizu und Fujisawa, 2003; Olsen, 2006; Davidson, 2007; Bodmer und Frasch, 2010).

Diese Sichtweise beeinflusst die Bewertung von Tiermodellen maßgeblich, v.a. in Bezug auf die Rolle physikalischer Kräfte bzw. von Umwelteinflüssen auf die Kardiogenese (Xavier et al., 2007). Unbestritten ist freilich die Notwendigkeit der zumeist mit geringerem technischen und bürokratischen Aufwand verbundenen Forschung an niederen Vertebraten und Invertebraten, da sie nicht nur phylogenetische Zusammenhänge aufdeckt, sondern auch entscheidende Impulse für die Forschungsarbeit an höheren Vertebraten liefert.

Die Komplexität der Thematik erforderte eine Anpassung an den erforderlichen Umfang einer Dissertation und an die Reproduzierbarkeit durch den Leser im Sinne einer Reduktion. Diese erfolgte auf Ebene der berücksichtigten Tierarten (Vogel und Säugetiere) aber auch inhaltlich. Die Entstehung der Innervation und Lymphgefäße des Herzens sowie das intrinsische adrenerge System finden hier keine Berücksichtigung. Das große Feld der kongenitalen Herzerkrankungen wurde ebenfalls nicht erarbeitet, da dies aus didaktischer Sicht und aufgrund seines Umfangs nicht sinnvoll erschien.

Auch die erst in jüngerer Zeit begonnene Erforschung von epigenetischen Einflüssen und von MikroRNAs auf die Kardiogenese wurde ausgeklammert. Chromatinremodellierung als epigenetischer Einflussfaktor auf die Gentranskription wird durch Histonmodifizierung via Methylierung, Acetylierung, Deacetylierung und andere Enzymreaktionen realisiert. Sie beeinflusst den Zugang der regulatorisch-transkriptionalen Proteinkomplexe zu Zielensequen-

zen und spielt auch in der Kardiogenese eine wichtige Rolle (Chang und Bruneau, 2012; Chamberlain et al., 2014; Ang et al., 2016a). MikroRNAs bezeichnen kurze, nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression posttranslational beeinflussen. Sie sind an der Regulation von Differenzierung und Proliferation von kardiogenen Vorläuferzellen beteiligt (Zhao et al., 2005, 2007b; Liu et al., 2008; Yan und Jiao, 2016).

Die Aufarbeitung dieser Themengebiete überschreitet den Rahmen dieses Projekts. Auf entsprechende Literaturstellen sei verwiesen.

Weitere Limitationen begründen sich auf der Art der Literaturrecherche und -aufbereitung: Dem Risiko, bedeutende Publikationen zu verfehlen, wurde mittels breiter Suche in verschiedenen Datenbanken und Katalogen entgegengewirkt. Die Frequenz bestimmter, in Publikationen verwendeter Stichwörter und Begriffe bzw. Kombinationen daraus (Bsp.: „Pitx2C“ und „left-right asymmetry“; „Isl-1“ und „Second Heart Field“) ist ebenfalls als verlässlicher Parameter für die Signifikanz ebendieser zu bewerten.

Risiken der Ergebnisverzerrung ergeben sich weiterhin aus der individuellen Sprachverständnis- und -verarbeitungsfähigkeit, da der überwiegende Anteil der Fachliteratur in englischer Sprache vorliegt, sowie aus einer z.T. begrenzten Objektivierbarkeit der Auswahlkriterien.

### 4.3 Die Herkunft der kardiogenen Progenitorzellen

Die pluripotenten Vorläufer kardiogener Zellen wandern aus dem posterioren Epiblasten in den Primitivstreifen (Lawson et al., 1991; Yatskievych et al., 1997). Im anterioren Drittel dieser Struktur erfolgt mittels Transkriptionsfaktor *MesPI*-Expression nicht nur die Festlegung auf ein kardiogenes Schicksal, sondern auch die Restriktion der Entwicklungspotenz (Costello et al., 2011; Chan et al., 2013; Lescroart et al., 2014). Hier sei noch einmal betont, dass die Position der Epiblastzellen im Primitivstreifen weitestgehend über ihr späteres Schicksal entscheidet.

Nachdem die kardiovaskulären Progenitoren also auf eine Zukunft als entweder endokardiale, myokardiale, epikardiale Zellen, (vaskuläre) glatte Muskelzellen oder aber bipotente Zellen programmiert wurden, wandern sie im Zuge der Gastrulation ins anteriore Seitenplattenmesoderm (Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Tam et al., 1997).

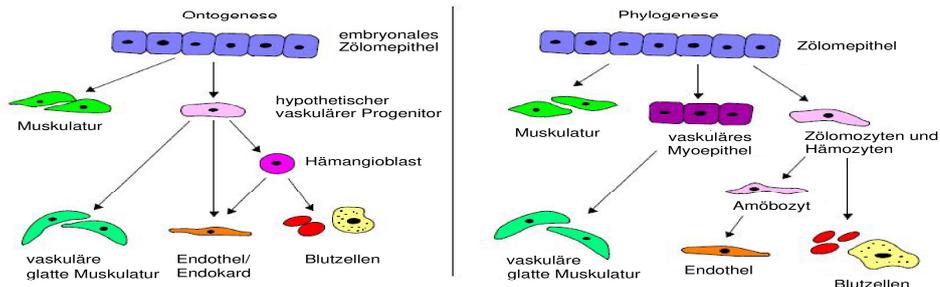
Der einzige nicht-mesodermale Beitrag zum Herzen erfolgt durch eine kleine Population ektodermaler Zellen aus der Region der Neuralleiste, den sogenannten kardialen Neuralleistenzellen (Kirby und Hutson, 2010; Arima et al., 2012).

Die Aufspaltung des Seitenplattenmesoderms führt zur Bildung des (perikardialen) Zöloms, ein Meilenstein nicht nur in der Ontogenese, sondern auch in der Phylogenese des Herzkreislaufapparats.

Das dem Transport nährstoffhaltiger Flüssigkeit dienende, zumeist durch Septen unterteilte, von einem (z.T. Myo-) Epithel ausgekleidete Zölom primitiver Invertebraten war vermutlich ein „Vorläufermodell“ für die echten Blutgefäße der Vertebraten. Letztere entstanden dorsal und ventral der Zölome in der extrazellulären Matrix. Das Überwinden der Septen generierte einen evolutionären Vorteil (Ruppert und Carle, 1983). Eine lange Reihe an Fakten deutet darauf hin, dass sowohl die vaskuläre glatte Muskulatur und Perizyten, als auch Endothelzellen und Blutzellen ursprünglich aus dem Zölomepithel rekrutiert wurden (Ruppert, 2005; Munoz-Chapuli et al., 1999, 2005; Hartenstein und Mandal, 2006; Xavier et al., 2007; Rosenthal und Harvey, 2010). Beim rezenten Lanzettfischchen sind die primitiven Blutgefäße nur von glatten Muskelzellen umgeben. Man geht davon aus, dass Endothelzellen sich aus ursprünglichen Blutzellen, motilen (ebenfalls dem Zölomepithel entstammenden) Amöbozyten-artigen Zellen, diversifiziert haben. Sie bildeten entlang der Gefäßwände interzelluläre Verbindungen aus.

Entscheidende evolutionäre Vorteile des Endothels waren vermutlich eine verbesserte Immunabwehr durch lokale Kooperation und Kommunikation mit (den eng verwandten) Blutzellen, Feinregulation des Blutflusses und die Fähigkeit zur Angiogenese, was eine Ausdehnung des Blutgefäßsystems in vom Zölom weit entfernte Körperregionen ermöglichte (Rosenthal und Harvey, 2010).

Gemäß dieser Hypothese entstammen die kardiovaskulären Zellen der embryonalen Zölomserosa, wobei sich offensichtlich die muskulären Vorläuferzellen (glatte Muskulatur, Kardiomyozyten) von den Hämangioblasten trennen, bevor diese in Häm- und Angioblasten segregieren (Rosenthal und Harvey, 2010; Hu et al., 2017; vergleiche auch Lescroart et al., 2014). Der gemeinsame Archetyp des Herzens ist demnach auf die Organisation einer dem embryonalen Zölomepithel entstammenden Schicht kontraktiler Myozyten zurückzuführen, das sekundär von Endothel/Endokard ausgekleidet wurde (Xavier et al., 2007) (siehe Abb.71).



**Abb.71:** Hypothese der ontogenetischen vs. der phylogenetischen Entwicklung hämovaskulärer Zellen; modifiziert nach Rosenthal und Harvey, 2010, Vol.1, S. 480, Fig.5

Auch über die initialen Ereignisse intraembryonaler Vaskulogenese (Bildung des primitiven Herzschlauchs, der Aorten und Vitellinvenen) hinaus behält das embryonale Zölomepithel via epithelio-mesenchymaler Transition die Fähigkeit zur lokalen Proliferation und Produktion von prävasculären Zellen. Dies erfolgt insbesondere in Nachbarschaft zu sich entwickelnden, vermutlich Vaskulogenese-induzierende Signale aussendenden, inneren Organen, wie der Leberanlage oder in der Aorten-Gonaden-Mesonephros-Region (Rosenthal und Harvey, 2010; Arima et al., 2012). So wird der primitive Herzschlauch fortwährend mit kardiogenen Zellen aus der proliferierenden Zölomwand (sogenanntes „Zweites Herzfeld“) gespeist.

Auch die Vorläuferzellen der Koronargefäße, die das Herz sekundär besiedeln, entspringen zum großen Teil dem stark proliferierenden Zölomepithel. Diese als Proepikardiales Organ angesprochene Struktur in der kaudalen Perikardhöhle unterscheidet sich in seiner prominenten, blumenkohlartigen Form und im transkriptionalen Profil vom Zweiten Herzfeld sensu strictu (Männer et al., 1992; Van Wijk et al., 2009; Mommersteeg et al., 2010). Der Begriff „Organ“ entspricht in diesem Fall nicht der gängigen Definition und sollte daher vermieden werden. Die ebenfalls geläufige Bezeichnung als Proepikardiale Serosa ist weniger irreführend. Man vermutet, dass diese kardiogene Zellpopulation ein evolutionäres Derivat des Primordiums eines urzeitlichen externen Nierenglomerulus ist (Pombal et al., 2008; Cano et al., 2015).

Der Nachweis einer Beteiligung proepikardialer Zellen am Aufbau der koronaren Gefäßwände in Form von vaskulären glatten Muskelzellen sowie Perizyten ist experimentell belegt und unbestritten (Perez-Pomares et al., 2002b; Schlueter et al., 2006; Christoffels et al., 2009). Der Ursprung koronarer Angioblasten ist hingegen noch immer nicht zweifelsfrei geklärt. Während einige Experimente für einen gemeinsamen Ursprung mit koronaren glatten Muskelzellen und Perizyten in der Proepikardialen Serosa bei ähnlichem oder abweichendem transkriptionalen Profil argumentieren (Perez-Pomares et al., 2002a; Guadix et al., 2006; Katz et al., 2012; Cossette und Misra, 2011), negieren andere einen Zusammenhang und verweisen auf Endokard und Sinus venosus-Endothel als Quelle koronarer endothelialer Progenitoren. Nach dieser Ansicht sprosst das Endothel/Endokard angiogen aus, um durch das Myokard an die subepikardiale Herzoberfläche zu gelangen und sich von dort, koronare Plexus bildend, weiter auszubreiten (Red-Horse et al., 2010; Grieskamp et al., 2011; Tian et al., 2013b; Wu et al., 2013c). Aktuellere Untersuchungen belegen, dass der überwiegende Anteil koronarer Endothelzellen aus Sinus venosus-Endothel, dicht gefolgt von Endokard und zu einem Anteil von nur unter 20% aus der Proepikardialen Serosa stammt (Chen et al., 2014b; Zhang et al., 2016).

Bemerkenswerterweise ist von den drei von Cosette und Misra (2011) entdeckten *WT1*-negativen Endothelzell-Vorläuferpopulationen in der Proepikardialen Serosa der Maus eine mit der Leberknospe und eine andere mit dem Sinus venosus-Endothel (!) assoziiert. Die dritte Vorläuferpopulation scheint ohne jeden Bezug zu benachbarten Geweben zu sein.

Abkömmlinge der zwei von Katz et al. (2012) identifizierten endothelialen Progenitorpopulationen im Proepikard fanden sich auch im Endothel des Sinus venosus und in Teilen des Endokards wieder. Kombiniert man diese Zusammenhänge mit dem Umstand, dass sich der Sinus venosus samt Endothel aus der Proliferationszone der proepikardialen Serosa generiert, liegt die Vermutung nahe, dass die proepikardialen koronaren Endothelzell-Vorläufer identisch sind mit den von Red-Horse et al. (2010), Tian et al. (2013b), Wu et al. (2013c), Chen et al. (2014b) und Zhang et al. (2016) im Sinus venosus-Endothel bzw. im Endokard entdeckten prospektiven koronaren Endothelzellen. Die unterschiedliche Expression Gewebe-spezifischer Marker in diesen drei angenommenen Vorläuferpopulationen ist möglicherweise durch den molekularen Einfluss der Umgebung zu erklären. Demzufolge müsste dann nicht zwischen unterschiedlichen Quellen für koronare endotheliale Vorläuferzellen, sondern vielmehr zwischen alternativen Wanderwegen der ursprünglich aus der proepikardialen Serosa stammenden Zellen differenziert werden, nämlich 1. vom Proepikardialen Organ via Perikardhöhle zur Herzoberfläche und 2. vom Proepikardialen Organ via Endothel/Endokard in das Myokard. Andererseits ist aber auch belegt, dass das Endokard per se die Fähigkeit besitzt, hämatopoietische Vorläuferzellen zu generieren, weshalb es als vom Proepikard unabhängige Quelle endothelialer Progenitoren durchaus in Frage kommt (Nakano et al., 2013).

Schwer nachvollziehbar ist auch die Annahme der Befürworter der Sinus venosus-Endothel- bzw. Endokard-Ursprungs-Theorie, dass prospektives koronares Endothel zunächst durch Sprossung (Angiogenese) durch das Myokard an die subepikardiale Herzoberfläche gelangt, dort aber und später auch im Myokard histologisch Blutgefäßentstehung im Sinne der Vaskulogenese nachgewiesen wurde (Katz et al., 2012; Chen et al., 2014b). Denkbar ist aber, dass beide Vorgänge parallel existieren.

In Studien an der Zebrafisch-Flosse und Mäuse-Retina beobachtete man, dass sich in neu entstehenden Gefäßbetten das arterielle Endothel überwiegend aus venösem Endothel entwickelt (Xu et al., 2014). Das scheint auch auf das koronare Gefäßbett zuzutreffen, da sowohl Sinus venosus-Endothel als auch die subepikardialen Plexus, aus denen die arteriellen intramyokardialen Plexus entstehen, einen venösen Phänotyp aufweisen. Dieser Umstand widerspricht der Annahme, dass arterieller und venöser Anteil der Koronargefäße aus verschiedenen Quellen stammen (Endothel/Endokard vs. Proepikardiale Serosa) (Wu et al., 2012). Sehr wahrscheinlich ist hingegen eine Kompartimentalisierung des koronaren Endothels hinsichtlich der Wanderwege seiner Vorläuferzellen bzw. seines unmittelbaren Herkunftsorts (Herz-Endothel vs. Epikard) (Zhang et al., 2016; reviewed in Sharma et al., 2017).

#### 4.4 Theorie der Herzfelder- zwei, drei oder doch nur eins?

Mit dem Aufkommen moderner molekularbiologischer Untersuchungsmethoden erlebte die lange in Vergessenheit geratene Erkenntnis, dass nach der Etablierung des initialen geraden Herzschauchs eine kontinuierliche Akquirierung zusätzlicher kardiogener Zellen an den venösen und arteriellen Pol des Herzens vonstatten geht, eine Renaissance (Arguello et al., 1975). Endlich konnte mittels Analysen der Genexpression und klonaler Entwicklung das hartnäckige Paradigma der ad hoc-Entstehung des geraden Herzschauchs mit allen Segmenten des reifen Herzens widerlegt werden (Benninghoff, 1923).

Die Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass das Herz zeitversetzt aus mindestens zwei, vermutlich bereits im Primitivstreifen voneinander segregierten Populationen kardiogener Progenitoren entsteht. Die darauf folgenden fehlgeschlagenen Versuche, die verschiedenen Herzprogenitorpopulationen mittels Verfolgung genetischer Marker wie *Isl1*, *FGF8/10*, *Nkx2.5*, *Tbx5*, *Tbx1*, eindeutig zu definieren und in Form der Herzfelder voneinander abzugrenzen, machten die Bedeutung der zeitlichen Dynamik der Kardiogenese deutlich. Die Expressionsmuster dieser Gene verändern sich zum Teil stark in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt und zeigen Überlappung in angrenzende Gewebe, sodass ihre Instrumentalisierung als spezielle „Herzfeldmarker“ kritisch beurteilt werden muss.

Die Unterteilung in Erstes und Zweites Herzfeld basiert in relativ guter Übereinstimmung mit klonalen Analysen von Meilhac et al. (2004a) auf der Analyse der *Isl1*-Expressionsdomäne. Demnach entstehen aus dem durch Differenzierungsmarker wie *Mlc2a* gekennzeichneten Ersten Herzfeld der initiale gerade Herzschauch mit linkem Ventrikel, Atrioventrikularkanal und einem geringen Teil der Atrien. Etwas später generiert sich aus dem *Isl1*-exprimierenden Zweiten Herzfeld, das sich nach der Herzschauchbildung in der perikardialen Zölomwand befindet, rechter Ventrikel, Atrien und Ausflusstrakt (Cai et al., 2003; Meilhac et al., 2004a). Die Entdeckung, dass *Isl1* nicht nur von allen präkardialen Zellen exprimiert wird, so auch vom Ersten Herzfeld zu einem früheren Zeitpunkt, sondern auch von nicht-kardiogenen Bereichen des Zöloms, stellte seine Bedeutung als (exklusiver) Marker des zweiten Herzfelds in Frage (Prall et al., 2007; Sun et al., 2007; Ma et al., 2008; Van den Berg et al., 2009) (siehe Abb.13).

Der Sinus venosus wird in dieser Anschauung ausgeklammert, da seine Progenitoren zwar noch vor der Herzschauchbildung die *Isl1*-Expression einstellen, er jedoch ontogenetisch wie die Strukturen des Zweiten Herzfelds erst relativ spät in Erscheinung tritt (Schlueter et al., 2006; Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010). Darüberhinaus besteht eine relativ enge klonale Verwandtschaft mit der *Isl1*-exprimierenden kaudalen Population des Zweiten Herzfelds (Lescroart et al., 2012). Angesichts des Beginns der *MesPI*-Expression im Primitivstreifen zeigt sich wiederum eine klare Übereinstimmung mit der Population des Ersten Herzfelds (Lescroart et al., 2014). Phylogenetisch betrachtet handelt es sich beim Sinus venosus um eine „alte“ Struktur, da er bereits im primitiveren Fischherzen vorkommt (Farmer, 1999). Diese widersprüchlichen Ergebnisse erschweren in der Tat eine Zuordnung dieser Vorläuferpopulation zum Ersten oder Zweiten Herzfeld, je nachdem ob der Deutungsschwerpunkt auf transkriptionalen (*MesPI*-Expression > Erstes Herzfeld) oder klonalen bzw. temporalen (Zweites Herzfeld) Aspekten liegt. Es scheint daher durchaus gerechtfertigt, hier ein Drittes Herzfeld zu deklarieren.

Das Anteriore Herzfeld umschreibt die FGF8/10-Expressionsdomäne, die während des Loopings den kranialen Teil des Herzschauchs und umgebendes pharyngeales Mesoderm markiert, aus denen rechter Ventrikel und Ausflusstrakt hervorgehen (Kelly et al., 2001; Abu-Issa et al., 2002; Zaffran et al., 2004; Ilagan et al., 2006; Watanabe et al., 2012). Davon abweichend exprimiert die posteriore Domäne des Herzschauchs einschließlich umgebendes Mesoderm *Tbx5* (Bruneau et al., 2001b). Es umfasst damit im Gegensatz zum Ersten Herzfeld

sowohl den linken Ventrikel und die vollständigen Atrien als auch den Sinus venosus (siehe Abb.13).

Auch die Expression von *Hox*-genen verdeutlicht eine antero-posteriore Musterbildung im Zweiten Herzfeld. Sie markiert jedoch, wie auch im Fall der *FGF8/10*- vs. *Tbx5*-Expressionsdomänen, keine physikalischen Grenzen für Progenitoren. Die antero-posteriore „Fluktuation“ der kardiogenen Progenitoren scheint äußerst ausgeprägt zu sein (Van den Berg et al., 2009; Bertrand et al., 2011; Dominguez et al., 2012).

Das Sekundäre Herzfeld definiert eine kleine, der *Tbx1*-Expressionsdomäne entsprechende Population mesodermaler Zellen aus dem Bereich der Kiemenbögen, die in Überlappung mit der *FGF8/10*-Domäne Ausflusstraktmyokard und glatte Muskulatur für die Wurzeln von Aorta und Truncus pulmonalis generieren (Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001; Dyer und Kirby, 2009). Aber auch diese Definition fällt unter die Ausführungen zum Anterioren vs. Posterioren Herzfeld, da die *Tbx1*-Expression fluktuiert und sich nicht nur auf Ausflusstrakt-Progenitoren im kranialen Zweiten Herzfeld beschränkt, sondern auch Zellen umfasst, die den venösen Herzpol speisen (Rana et al., 2014) (siehe S.21, Abb.13).

Klonale Analysen zeigen eine starke Übereinstimmung mit dem Modell des Ersten und Zweiten Herzfelds. Die Abwesenheit absoluter klonaler Restriktion von benachbarten Komponenten mit beträchtlicher Überlappung der zwei Zellstammlinien im rechten Ventrikel argumentiert jedoch ebenfalls gegen ein streng segmentales Modell der Herzentwicklung. Dieses sieht, basierend auf Genexpressionsmustern, eine strikte klonale Trennung der Herzkompimente nach ihrer Herkunft aus dem entsprechenden Herzfeld vor.

Argumentiert man auf phylogenetischer Grundlage, so enthält das „klassische“ Herzfeld die Vorläuferzellen für die systemische Zirkulation (Sinus venosus, Atrium, linker Ventrikel, myokardialer Ausflusstrakt), wie es bei primitiven Vertebraten, wie den Knochenfischen der Fall ist. Die Komponenten für die pulmonale Zirkulation (rechter Ventrikel, Atriensepten, Vena pulmonalis, Ausflusstraktsepten) bei höheren Vertebraten rekrutieren sich aus einem „neuen“ Herzfeld (Holmes, 1975; Farmer, 1999; Moorman et al., 2007).

Die Schwächen der elaborierten Herzfelddefinitionen bei der Synchronisierung räumlich-zeitlicher morphologischer Entwicklungsmuster mit entsprechender Genexpression stellen die Notwendigkeit, unterschiedliche Herzfelder zu definieren, in Frage. Genexpression ist stets nur als sekundäre Eigenschaft von Zellen zu werten (Lescroart et al., 2012). Die differenzierte Musterbildung führt innerhalb des originär homogenen Herzfeldes zu räumlicher Sortierung und progressiver Restriktion ursprünglich einheitlicher Zellklone, was eine zeitlich abgestufte Entstehung der unterschiedlichen Herzkompimente zur Folge hat.

Diese Vorstellung entspricht auch dem Konzept über die Entwicklung der Zelldiversität. Es konstatiert, dass Unterschiede in der Konzentration diffundierender Morphogene\* unterschiedliche Zellschicksale ursprünglich einheitlicher multi- oder omnipotenter Zellen kreieren. Hierbei kommt es zur progressiven Restriktion der Entwicklungspotenz und einer fortschreitenden Zelldiversität innerhalb eines Feldes, das ursprünglich homogen war (Gurdon et al., 1999; Ashe und Briscoe, 2006).

Bezogen auf das Herzfeld bedeutet dies, dass ursprünglich alle Zellen die Fähigkeit besitzen, verschiedene Herzkompimente zu bilden, abhängig von ihrer Position im Primitivstreifen bzw. im Herzfeld. Durch immer feiner werdende Musterbildung im ursprünglich einheitlichen Herzfeld kommt es zur Diversifikation der Zell-Schicksale einhergehend mit zeitlich abgestufter Entstehung der einzelnen Komponenten des Herzens (Abu-Issa et al., 2004; Moorman et al., 2007; Abu-Issa, 2014).

Der letzte gemeinsame multipotente Progenitor dieser Zellen ist wahrscheinlich die in den Primitivstreifen einwandernde *Eomes*-positive und (noch) *MesP1*-negative Epiblastzelle (Lescroart et al., 2014).

Die Herzfeldtheorie beförderte das Verständnis der Kardiogenese, insbesondere über die Regulationsmechanismen in den verschiedenen Subdomänen des kardiogenen Mesoderms

**Morphogene:**  
Signalmoleküle, die Konzentrationsabhängig die Musterbildung in der Entwicklung vielzelliger Organismen steuern

enorm und führte zum endgültigen Bruch mit der althergebrachten Vorstellung, der Herzschlauch enthalte von Anfang an alle Kompartimente des reifen Herzens. Konflikte mit der starken räumlich-zeitlichen Dynamik in Morphogenese und Genexpression im kardiogenen Mesoderm, zwangen aber dazu, von einer starren Einordnung der Herzfelder wieder Abstand zu nehmen.

## 4.5 Asymmetrische Organogenese und Tücken bei der Visualisierung komplexer dreidimensionaler Prozesse

### 4.5.1 Grundlagen der Links-rechts-Asymmetrie

Das Herz ist das erste Organ, das mit der bilateralen Symmetrie des Embryos bricht. Ausgangspunkt hierfür ist der Primitivknoten (Maus) bzw. Hensenknoten (Huhn). Bereits im Laufe der Gastrulation manifestiert sich hier die Grundlage für eine asymmetrische Genexpression von linkem versus rechtem Seitenplattenmesoderm. Während die (asymmetrischen) Genexpressionskaskaden unter Beteiligung von *Shh*, *Activin-Rezeptor 2A* (nur Huhn), *BMP4*, *FGF8* sowie *Lefty*, an deren Ende die linksseitige Expression von *Nodal* und *Pitx2C* steht, relativ umfang- und aufschlussreich identifiziert wurden, mangelt es noch an einer hinreichenden Erklärung für den (die) initialen Auslöser der asymmetrischen Genexpression. Allen bislang untersuchten Spezies scheint ein gerichteter Fluss extrazellulärer Flüssigkeit um den Primitiv- bzw. Hensenknoten herum („nodal flow“) als treibende Kraft für die molekulare Asymmetrie gemein (Levin et al., 1995; Isaac et al., 1997; Ryan et al., 1998; Boettger et al., 1999; Campione et al., 1999; Meyers und Martin, 1999; Tsukui et al., 1999; Ishimaru et al., 2000; Meno et al., 2001; Brennan et al., 2002; Fujiwara et al., 2002; Marquez et al., 2004; Nakamura et al., 2006b; reviewed in Campione und Franco, 2016).

Bei den meisten Tierarten wird der „nodal flow“ durch motile Zilien an der Unterseite des Primitivknotens generiert. Diese Zilien fehlen bei Huhn, Schwein und Rind. Da auch niedere Vertebraten wie Zebrafisch und Krallenfrosch über diesen Mechanismus verfügen, geht man davon aus, dass er bei Huhn, Schwein und Rind sekundär verloren ging (Qiu et al., 2005; Speder et al., 2006; reviewed in Blum et al., 2009).

Stattdessen scheinen beim Huhn durch asymmetrische Aktivität von Ionenpumpen generierte Differenzen in der Membranspannung zwischen rechter und linker Seite des Hensenknotens verantwortlich für den „nodal flow“ (Levin et al., 2002; Adams et al., 2006; Aw et al., 2008). Mit der Flüssigkeit werden auch Zellen von rechts nach links transportiert. In der daraus folgenden morphologischen Asymmetrie vermutet man auch die Ursache der asymmetrischen Genexpression, die in linksseitiger *Nodal*-Dominanz mündet (Garcia-Castro et al., 2000; Mendes et al., 2014).

Bei der Maus führt der ziliengesteuerte Flüssigkeitsstrom um den Primitivknoten herum durch linksseitige Kalziumionen-medierte Hemmung des *Nodal*-Antagonisten *Cerl2* zur Etablierung des *Nodal*-Signals mit nachfolgender Ausbreitung in das linke Seitenplattenmesoderm (Yoshida et al., 2012; Takao et al., 2013; Inacio et al., 2013).

Als unmittelbare Auswirkungen der asymmetrischen Genexpression auf die Organogenese kommt zum einen die *Pitx2C*-bedingte asymmetrische Zellproliferation im kardiogenen Mesoderm in Frage (Linask et al., 2002, 2005).

Zum anderen nimmt man an, dass die (rechts betonte) asymmetrische Expression von Induktoren der epithelio-mesenchymalen Transition wie *Snail1* (Huhn, Maus, Zebrafisch) und *Prrxl* (Huhn, Zebrafisch), welche gleichzeitig die *Nodal-Pitx2C*-Achse unterdrücken, zu einer stärkeren Aktivierung der epithelio-mesenchymalen Transition im rechten Herzmesoderm und nachfolgend asymmetrischen Zellbewegungen zur Mittellinie im Zuge der Herzschlauchbildung und entsprechender Asymmetrie des Herzschlauchs führen (Patel et al., 1999; Murray und Gridley, 2006; Ocana et al., 2017).

#### 4.5.2 Bildung des geraden Herzschauchs

Nach der klassischen Sichtweise erfolgt die Herzschauchbildung durch direkte Konvergenz der bilateralen Herzfelder ohne Rotation in gerader Linie in der ventralen Mittellinie des Embryos, wobei die antero-posteriore Polarität der Herzprogenitoren ausgehend vom Primitivstreifen über sämtliche Phasen der Herzschauchbildung konserviert ist (De Haan, 1965; Garcia-Martinez und Schoenwolf, 1993; Fishman und Chien, 1997).

Neuere Studien belegten jedoch, dass die antero-posteriore Polarität der kardiogenen Vorläuferzellen im Primitivstreifen in eine mediolaterale Polarität in den bilateralen Herzfeldern wechselt, um sich dann mittels Rotation um  $125^\circ$  im primitiven, halb offenen Herzschauch wieder in die ursprüngliche antero-posteriore Polarität zu verkehren (Cai et al., 2003; Abu-Issa und Kirby, 2008; Cui et al., 2009a).

Entscheidend für das Verständnis solch räumlich komplexer Vorgänge ist die korrekte Visualisierung an Hand geeigneter Bilder, wie in der Abbildung 16B auf Seite 28 am Beispiel der Verhältnisse beim Mäuseembryo dargestellt.

Im Gegensatz dazu entspricht die noch immer in Lehrbüchern verwendete veraltete Darstellung der Fusion der Herzschauche aus Abbildung 3 auf Seite 8 nicht mehr den modernen Erkenntnissen. Dieses Schema veranschaulicht zwar eine Rotation (um  $180^\circ$ ), jedoch ist der Verlauf der endokardialen Schläuche (die zu diesem Zeitpunkt noch nicht so klar definierbar sind) inkorrekt. Die später fusionierenden Schenkel der proendokardialen Schläuche müssten mit den Vitellinvenen statt mit den ventralen Aorten in Verbindung stehen. Aus der Scheitelregion des initial hufeisenförmigen Proendokards gehen die Verbindungen zu den ventralen Aorten hervor. In der obsoleten Abbildung stellt es sich fälschlicherweise so dar, dass das hufeisenförmige Proendokard von Beginn an nicht mit den Vitellinvenen, sondern mit den (ventralen) Aorten in Kontinuität steht, die zunächst aus der Scheitelregion nach posterior verlaufen, um dann im Verlauf der Rotation des Proendokards nach anterior zu weisen. Die Ventral-Rotation der Vitellinvenen wird demzufolge auch nicht aufgegriffen. Dies entspricht nicht den realen Verhältnissen.

Auch die überholte Vorstellung von der Entstehung und späteren Fusion zweier separater Herz- bzw. Endokardschläuche wird durch diese irreführende Darstellung befördert. Diese Annahme beruhte zum einen auf der Fehldeutung der bereits in den bilateralen Herzfeldern zwischen Promyokard und Proendokard gebildeten Herzgallerte als Lumen, zum anderen auf der Bildung von Cardia bifida (zwei Herzschauche) bei Störung des Fusionsprozesses (De Haan, 1959; De Ruiter et al., 1992; Kuo et al., 1997; Compennolle et al., 2003). Während die von Beginn an bestehende Singularität der myokardialen Umhüllung des Herzschauchs mittlerweile nicht mehr angezweifelt wird, gibt es hinsichtlich des Endokards noch keine einheitliche Meinung. Jedoch weisen sowohl ältere als auch aktuelle morphologische Studien an Hühnchen und Mäusen deutlich darauf hin, dass das Endokard zum Zeitpunkt der Fusion der bilateralen Primordien noch weitestgehend plexiform und selbst nach Etablierung des primitiven Herzschauchs noch lückenhaft und „unreif“ ist (De Ruiter et al., 1992 und 1993; Drake und Fleming, 2000; Hara et al., 2016).

#### 4.5.3 Looping

Die Herzschleifenbildung repräsentiert als ein weiterer, lange Zeit unzureichend verstandener Schlüsselprozess der Kardiogenese die Schwierigkeit, komplexe dreidimensionale Prozesse korrekt zu interpretieren.

Die obsolete Darstellung des geraden Herzschauchs mit allen, durch Einschnürungen voneinander getrennten Kompartimenten des reifen Herzens (sog. Segmenttheorie) erschwerte viele Jahrzehnte die Generierung eines plausiblen Konzepts (Benninghoff, 1923). Moorman

und Christoffels (2003) analysierten diese Hemmnisse und stellten durch ihre Ballontheorie die Weichen für eine moderne Sichtweise (siehe Kap. 2.5.2).

In dieser im Englischen so prägnant als Looping bezeichneten Phase kommt es nach initialer Ventralkrümmung zur Rotation und anschließend geringfügiger Detorsion des sich fortwährend verlängernden und an beiden Polen fixierten primitiven Herzschauchs in der engen Perikardhöhle. Dadurch werden die immer augenscheinlicher hervortretenden Herzkompimente nicht nur zusammengedrängt, sondern in ihre definitiven topographischen Beziehungen zueinander gebracht (Männer, 2000; 2009; 2013).

Traditionell unterscheidet man das C- resp. Dextrallooping, da von ventral betrachtet die Ventrikelschleife C-förmig nach rechts weist, und das (frühe und späte) S-Looping, dessen Bezeichnung ebenfalls auf der scheinbaren Form beruht. Diese Nomenklatur basiert jedoch auf einem mangelhaften Verständnis und verschleiert die wahre Natur dieses Prozesses, nämlich die einer Rotation mit dem Ergebnis einer linksgewundenen Helix. Insbesondere die Deklaration des ersten Teilprozesses als „Rechtskrümmung (engl. rightward bending)“ ist obsolet, wird aber auch in aktuellen Publikationen noch verwandt (siehe Poelmann et al., 2014; Anderson et al., 2016b).

Denkbar wäre eine alternative Unterteilung des Loopings nach präziseren biophysikalischen Gesichtspunkten (z.B. Ventralkrümmung, Rotation, Detorsion).

Als verursachende Kräfte werden eine Reihe an intrinsischen und extrinsischen Faktoren diskutiert. Die Ventralkrümmung scheint allein auf intrinsischen Ursachen, wie differentieller Hyperplasie der Kardiomyozyten mit konsekutiven differentiellen Zellformveränderungen an innerer resp. äußerer Krümmung zu basieren (Manasek et al., 1972; Itasaki et al., 1989; Shiraishi et al., 1992; Latacha et al., 2005; Remond et al., 2006; Shi et al., 2014).

Ursachen für die Rotation sind neben der inherenten Asymmetrie des Herzschauchs selbst, in Zusammenspiel mit der Verlängerung des durch die Perikardhöhle begrenzten Herzschauchs, die Flexion der embryonalen Kopfstrukturen (Stalsberg, 1970; Voronov et al., 2004; Linask et al., 2005; Kidokoro et al., 2008; Ramasubramanian et al., 2013; Bayraktar und Männer, 2014). Die komplementäre Windung ausgehend vom venösen Herzpol in der Spätphase des Looping ist eine natürliche biophysikalische Reaktion auf den Rotations-bedingten Spannungsanstieg innerhalb des Herzschauchs. Sie vermindert die Spannung und führt zur Bildung einer als helikale Verdrehung bezeichneten Struktur (Männer, 2013).

Insgesamt betrachtet steckt die Erforschung der Ursachen des Loopings noch in den „Kinderschuhen“. Die Erkenntnisse sind lückenhaft und relativ unsicher, was der Vielzahl und Verschiedenartigkeit der beteiligten Faktoren und deren Wechselwirkung miteinander geschuldet ist. Vor allem fehlt es an einer Verknüpfung der biomechanischen Aspekte des Loopings mit Aspekten der Wachstumsdynamik des Herzschauchs (Stichwort: Ballontheorie, Expansion der Vor- und Hauptkammern sowie Remodellierung der inneren Krümmung) und den zugrundeliegenden transkriptionalen Netzwerken. Ein bedeutsamer, wenn nicht der bedeutendste Aspekt hierbei sind die hämodynamischen Kräfte und ihre Übersetzung in regionale genetische Programme entlang der inneren und äußeren Krümmung des Herzschauchs. In Form der zyklischen Dehnung beeinflusst die Hämodynamik in den Kardiomyozyten der äußeren Krümmung die Expression kontraktile Proteine. Ohne Störung verlaufend mündet dieser Adaptationsprozess in einer Art „Kräftegleichgewicht“ zwischen Kontraktion und Dehnung. Scherspannung als zweite hämodynamische Kraft wirkt sich über den Einfluss auf biochemische und transkriptionale Kaskaden (*eNOS*, *KLF2*, *ET1*) auf die Entstehung der Herzklappen und Septen aber auch die Expansion des Arbeitsmyokards aus. Das konkrete molekulare Zusammenspiel der bislang identifizierten Faktoren ist noch unbekannt. Man vermutet den *Notch*-Signalweg als Vermittler zwischen Hämodynamik und Morphogenese (reviewed in Santhanakrishnan und Miller, 2011 und Granados-Riveron und Brook, 2012).

Bezogen auf das Looping ließen sich die Erkenntnisse wie folgt zusammenfassen: Der Blutfluss wird im Herzschauch stufenweise etabliert und spielt für die Ventralkrümmung und die initiale Kammerexpansion keine Rolle (Mc Grath et al., 2003; Itasaki et al., 1991; Nishii

und Shibata, 2006). Die (dorso-ventral) regionalisierte Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, die Proliferation und Differenzierung regulieren, wie *eHAND* bei der Maus im ventralen Teil des geraden Herzschauchs, sind hierfür vermutlich (mit-) verantwortlich und führen zu dorso-ventral asymmetrischer Zellmorphologie (Togi et al., 2004; McFadden et al., 2005; Risebro et al., 2006). Die nachfolgende Rotation des an beiden Polen fixierten Herzschauchs kommt durch seine Elongation innerhalb der begrenzenden Perikardhöhle durch überwiegend mechanische Zwänge zustande. Dadurch bilden sich äußere und innere Krümmung, die sich maßgeblich in der Art und Stärke der durch beginnenden Blutfluss auf sie einwirkenden hämodynamischen Kräfte unterscheiden. Diese stetig anwachsenden Kräfte (Dehnung vs. Scherspannung) treiben die geno- und phänotypische Diversifikation zwischen expandierendem Arbeits- bzw. Kammermyokard an der äußeren Krümmung und dem sich verdichtenden Primärmyokard an der inneren Krümmung maßgeblich voran. Sie sind unerlässlich für die korrekte Topogenese der unterschiedlichen Herzkammern und die vollständige Separation zweier paralleler Blutströme unter Ausbildung von Septen und Herzklappen (Berdougo et al., 2003; Zamir et al., 2003; Dekker et al., 2005; Hirschy et al., 2006; Soufan et al., 2006; Lehoux et al., 2006; Van der Heiden et al., 2006; Linask und Van Auker, 2007; Auman et al., 2007; Groenendijk et al., 2004, 2007, 2008; Liu et al., 2007a, 2011; Lin et al., 2012c; Bharadwaj et al., 2012; Chiplunkar et al., 2013).

## 4.6 Trennung von Körper- und Lungenzirkulation

### 4.6.1 Separierung von Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt und Entstehung der assoziierten Herzklappen

Bereits im tubulären Stadium des Herzens manifestieren sich zwei parallel verlaufende Blutströme. Sie beeinflussen maßgeblich die korrekte Entwicklung von Septen und Herzklappen, welche die vollständige physikalische Trennung von systemischer und pulmonaler Zirkulation vollziehen (Hogers et al., 1995, 1997, 1999; Stekelenburg de Vos et al., 2003; Anderson et al., 2003b; Midgett et al., 2014, 2015, 2017).

Septierung und Herzklappenentstehung in Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt, Regionen, die einer besonders hohen Scherspannung ausgesetzt sind, weisen signifikante Analogien auf. So fusionieren die gegenüberliegenden, auf myokardialer Grundlage aus endokardialer epithelio-mesenchymaler Transition entstehenden Herzkissen zum Septum (Markwald et al., 1977, 1979; Ya et al., 1998; Qayyum et al., 2001; De Lange et al., 2004; Anderson et al., 2012). Auch die transkriptionalen Grundlagen für diese Prozesse weisen starke Parallelen auf (siehe Kap.3.3.1 und 3.3.2). Nach der mit Verkürzung des myokardialen „Kanals“ einhergehenden Septumbildung generiert sich an den dem Septum gegenüberliegenden Wänden je ein weiteres Paar endokardialer Herzkissen, das jedoch überwiegend von nicht-endokardialen Mesenchymzellen bevölkert wird. Diese Zellen rekrutieren sich im Atrioventrikularkanal aus dem Epikard und im Ausflusstrakt aus dem Zweiten Herzfeld bzw. sekundär aus kardialen Neuralleistenzellen (Wessels et al., 1996; Ya et al., 1998; De Lange et al., 2004; Rana et al., 2007; Jain et al., 2011; Anderson et al., 2012; Sizarov et al., 2013). Die mit den jeweiligen Strukturen assoziierten Herzklappen formieren sich aus Anteilen der ursprünglichen Herzkissen (Qayyum et al., 2001; Webb et al., 2003; De Lange et al., 2004). Unter maßgeblichem Einfluss hämodynamischer Kräfte und im Sinne einer Anpassung an diese remodellieren die Herzklappen schließlich in ihre reife Form (Lincoln et al., 2004; Hinton et al., 2006; Butcher et al., 2007a; Kruithof et al., 2007; Tan et al., 2011, 2013).

Die Überreste des primären Myokards von Atrioventrikularkanal und Ausflusstrakt, die ursprünglich sehr ausgedehnt waren, beschränken sich nach der Septierung auf eine kleine klappennahe glattwandige Region der Atrien bzw. auf die kurze subvalvuläre Ausflussregion der Ventrikel (Oosthoek et al., 1998; Ya et al., 1998; De Lange et al. 2004).

Anders als früher angenommen, spielen die kardialen Neuralleistenzellen auch durch physischen Beitrag eine wichtige Rolle beim Aufbau der vaskulären glatten Muskulatur der intraperikardialen Anteile von Aorta und Truncus pulmonalis (Gao et al., 2010; Sizarov et al., 2012; Anderson et al., 2013).

Die Ursachen für das Umeinanderwinden von Aorta und Truncus pulmonalis sind noch undurchsichtig. Die von Beginn an spiralförmige Konformation der Endokardkissen ist unbestreitbar. Sie ergibt sich aus der Rotation des Ausflusstrakts und damit verbundener Veränderung der hämodynamischen Krafteinwirkung.

Das „pulmonary push-Konzept“ von Scherptong et al. (2012) bietet einen schlüssigen Ansatz, ist aber auch nicht ganz unumstritten. Nach dieser Theorie wird die Zutrittsöffnung der Pulmonalarterie in den rechten Ventrikel durch die verstärkte Addition subpulmonalen Myokards aus dem Bereich der linken sechsten Kiemenbogenarterie in eine Position rechts kranial der zentral und kaudal davon gelegenen zukünftigen Aortenöffnung in den linken Ventrikel „gedrückt“.

Damit im Einklang steht die Erkenntnis, dass der linksseitig exprimierte Transkriptionsfaktor *Pitx2C* für die asymmetrische Zellproliferation im Zweiten Herzfeld und die Rotation des Ausflusstrakts verantwortlich ist (Yashiro et al., 2008).

#### 4.6.2 Entstehung der Vorkammer- und Hauptkammersepten

Im Unterschied zu Atrioventrikular- und Ausflusstraktseptum sind die Septen von Atrien und Ventrikeln persistent, muskulär und entstehen in Regionen mit geringer Scherspannung.

Zu den Strukturen, die zur Teilung des ursprünglich gemeinsamen Atriums beitragen, gehören: Septum primum, dorsale interatriale Falte (Septum secundum), dorsale mesenchymale Protrusion. Einige Forscher kritisieren die Bezeichnung eines Septum secundum, da es sich nicht um eine richtige Scheidewand, sondern lediglich eine geringfügige Einfaltung der Dorsalwand der Atrien handelt, die im Zuge der Inkorporation der systemischen venösen Zuflüsse in den rechten und der Pulmonalvenen in den linken Vorhof zustande kommt (Mori et al., 2015; Poelmann et al., 2014; Anderson et al., 2016a). Die Verschmelzung der mesenchymalen Ränder von Septum primum und dorsaler mesenchymaler Protrusion mit den mesenchymalen Geweben der atrioventrikulären bzw. interventrikulären Region führt zur Separation von rechtem und linkem Vorhof. Das durch Apoptose im Zentralteil des Septum primum gebildete Foramen ovale wird dorsal von der dorsalen interatrialen Falte und ventral von der muskularisierten mesenchymalen Kappe des Septum primum sowie der muskularisierten dorsalen mesenchymalen Protrusion begrenzt (Snarr et al., 2007b; Schleich et al., 2009; Anderson et al., 2016a).

Alle genannten septalen Gewebe einschließlich der dorsomedialen Wand der Atrien wie auch die Vena pulmonalis bilden eine sich von den übrigen atrialen Geweben abgrenzende transkriptionale Domäne und entspringen dem Zweiten Herzfeld (Franco et al., 2000; Snarr et al., 2007a). Hier regulieren vom Lungenentoderm stammende *Shh*-Signale im Zusammenspiel mit *Tbx5* und *GATA4* Proliferation, Spezifikation und Migration der Vorläuferzellen dieser Strukturen (Godderris et al., 2008; Hoffmann et al., 2009, 2014; Xie et al., 2012; Ang et al., 2016b; Zhou et al., 2017).

Diese Argumente befürworten eine Deklaration dieser septalen und damit assoziierten Strukturen als phylogenetisch „neue“ Errungenschaft, die in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung der Lungenatmung steht.

Ein aktives Wachstum des myokardialen Septum interventriculare in atriale Richtung erscheint auf den ersten Blick plausibel, beruht aber auf einer Fehlinterpretation morphogenetischer Studien (Harh und Paul, 1975; De la Cruz et al., 1997). Aktuellere Untersuchungen legen dar, dass es durch das „Nachschieben“ von Myokard aus den proliferationsaktiven ventrikulären Wänden von rechtem und linkem Ventrikel in entgegengesetzte Richtung zu den Atrien wächst, also von der Basis zur Apex (Herzspitze). Dass das Foramen interventriculare, das am Ende der Septierung von mesenchymalen Geweben verschlossen wird, seine Größe während des gesamten Prozesses nicht verändert, stützt diese Ansicht (Conteras-Ramos et al., 2008, 2009; Gerhardt et al., 2013).

Während eine Vielzahl an Regulatoren der Proliferation des Kammermyokards als Voraussetzung für die Entwicklung des Septum interventriculare bekannt sind (siehe Kap.3.2.1), ist unklar, wie sich an der entscheidenden Stelle der Sulcus interventricularis bildet. Erwiesen ist zumindest, dass die Grenze zwischen den Expressionsdomänen von *Tbx5* (linker Ventrikel) und *Tbx20* (rechter Ventrikel) die Identitäten der Ventrikel und damit auch die Lokalisation des Septum interventriculare determiniert (Yamada et al., 2000; Takeuchi et al., 2003).

Im Grunde kommt es initial zur bloßen Einfaltung der ventrikulären Wand im kranialen Teil der Ventrikelschleife des Herzschlauchs. Ihre Bildung scheint mit der Expansion der einzelnen, genetisch (*Tbx20* vs. *Tbx5*) als separate Entitäten determinierten Ventrikel in explizit ventrale Richtung stromabwärts des Atrioventrikularkanals zusammenzuhängen (Poelmann et al., 2014). Die Myokardfalte (auch primäres interventrikuläres Septum genannt) schafft als anatomische Voraussetzung einen „Kristallisationspunkt“ für das Aneinanderhaften der Trabekel im interventrikulären Bereich. Die anschließende Fusion der gegen-

überliegenden Ventrikelwände ist abhängig von den in den Sulcus interventricularis einwandernden Epikardzellen (Mahtab et al., 2008; Poelmann et al., 2014). Es ist jedoch noch weitgehend unbekannt, wie dieser Vorgang reguliert wird.

Septumdefekte gehören zu den häufigsten angeborenen Anomalien des Herzens bei Mensch und Tier. Grob unterteilt man sie in atriale, ventrikuläre und atrioventrikuläre Septumdefekte. Neben den septalen Strukturen des Atriums (Septum primum, dorsale interatriale Falte, dorsale mesenchymale Protrusion), des Atrioventrikularkanals (Atrioventrikularseptum) und des Ventrikels (interventrikuläre Falte und trabekulärer sowie membranöser Teil des Ventrikelseptums), ist auch das muskularisierende proximale Ausflusstraktseptum wichtiger Bestandteil der Septen (Poelmann et al., 2014; Anderson et al., 2016a).

## 4.7 Remodellierung des venösen Herzpols

Als Sinus venosus bezeichnet man nach dem Looping das embryonale Einmündungssegment des Herzschlauchs, das von den intraperikardialen Anteilen der von Myokard umgebenen Vv. cardinales communes und deren gemeinsamen Sinus verkörpert wird (Mommersteeg et al., 2010). Fälschlicherweise wird dieser Begriff oft schon für den primitiven Einflussbereich der Vv. vitellinae im initial geraden Herzschlauch verwendet.

Der Sinus venosus wird später in den rechten Vorhof inkorporiert. Die Überreste der Sinushörner persistieren tierartlich unterschiedlich als Anteile von venösen Gefäßen, die ins rechte Atrium drainieren (Christoffels et al., 2006; Mommersteeg et al., 2010; Sizarov et al., 2010; Anderson et al., 2016a). Die originär bei allen Tierarten singuläre Vena pulmonalis entsteht de novo im dorsalen Mesokard und drainiert ursprünglich mittig/bilateral in das primitive Einflussegment, bevor ihre Mündung ins linke Atrium verlagert wird (Van den Berg und Moorman, 2011; Mommersteeg et al., 2007a).

Umstritten ist noch immer die topogenetische Beziehung zwischen den systemischen und pulmonalen venösen Zuflüssen zum Herzen.

Insbesondere im Hinblick auf das Verstehen der Ätiologie von Herzerkrankungen, wie z.B. das Auftreten der Pulmonalvenenmündung entstammender Arrhythmien oder die Ausprägung abnormaler Pulmonalvenenverbindungen, ergibt sich die Notwendigkeit, diese Prozesse aufzuschlüsseln und ein einheitliches Konzept zu verfolgen.

Es scheint notwendig, um Verwirrung vorzubeugen, hier zwischen morphogenetischer, klonaler und genetischer Beziehung der venösen Komponenten zu differenzieren, denn die unterschiedlichen Beziehungen schließen einander nicht zwingend aus bzw. ein. Es hat sich klar herausgestellt, dass eine genotypische Übereinstimmung zwischen Vena(e) pulmonalis(es) und Venae cavae hinsichtlich der *Podoplanin*- und *HNK1*-Expression kein tragfähiges Argument für einen gemeinsamen klonalen Ursprung beider Progenitorpopulationen bildet, gleichzeitig aber abweichende Expressionsmuster von *Nkx2.5* (V. pulmonalis+, Sinus venosus-) und *Tbx18* (V. pulmonalis-, Sinus venosus+) eine enge Verwandtschaft nicht ausschließen ((De Ruiter et al., 1995; Blom et al., 1999, 2001; Mahtab et al., 2008; Douglas et al., 2009b; Lescroart et al., 2012).

Aus morphogenetischer Sicht entspringen Sinus venosus und Vena pulmonalis nicht exakt derselben Region (kaudoventrale Zölomwand resp. kaudodorsale Zölomwand via dorsales Mesokard) aber doch in relativ enger Nachbarschaft. Im weiteren Verlauf mündet die Vena pulmonalis nicht gemeinsam, sondern separat vom Sinus venosus in das Atrium bzw. ein dem Atrium vorgeschaltetes Segment (Webb et al., 2001; Soufan et al., 2004; Anderson et al., 2006a; Männer und Merkel, 2007; Van den Berg und Moorman, 2011).

Die klonale Analyse von Lescroart et al. (2012) zeigt, dass mittels linksseitiger *Pitx2*-Expression eine recht frühe Segregation der Zellstammlinien von rechter versus linker Seite im Zweiten Herzfeld erfolgt. Im Gegensatz dazu ist die Festlegung einer antero-posteroren Identität der Vorläuferzellen im Zweiten Herzfeld nicht sehr ausgeprägt. Daraus folgt, dass bei der Maus das Myokard der linken Vena cava cranialis tatsächlich eine engere Verwandtschaft zum Myokard der Vena pulmonalis aufweist als zur rechten Vena cava cranialis (Lescroart et al., 2012).

Weitere Studien untermauern eine hohe „Fluktuation“ zwischen kaudalem und kranialem Pol des Zweiten Herzfelds (Van den Berg et al., 2009; Bertrand et al., 2011; Dominguez et al., 2012).

Erstaunlicherweise besteht also ein recht hoher Grad an (klonaler) Verwandtschaft zwischen den ipsilateralen Strukturen am venösen Herzpole trotz z.T. stark divergenter Genexpression, insbesondere zwischen der *Isl1*-positiven und der *Isl1*-negativen Domäne, die zum Teil als voneinander völlig unabhängige Populationen betrachtet werden.

#### 4.8 Rekrutierung oder Präspezifikation? Der Ursprung des Erregungsleitungssystems

Das Erregungsleitungssystem des Herzens geht aus dem primären Myokard des primitiven Herzschauchs an bestimmten Regionen hervor, an denen mit Ausnahme des Purkinjefasernetzwerks die Expression von *Tbx2* oder *Tbx3* eine Differenzierung in Arbeitsmyokard verhindert (Moorman et al., 1998; reviewed in Moorman und Christoffels, 2003). Der Sinusknoten entsteht in einer kleinen *Tbx3*-positiven Domäne im rechten Teil des Sinus venosus, der Atrioventrikularknoten im *Tbx2/3*-exprimierenden Atrioventrikularkanalmyokard. Atrioventrikulärbündel, Bündelverzweigungen, die anfänglich noch *Tbx3* exprimieren, sowie Purkinjefasern gehen aus dem Trabekelmyokard der primitiven Ventrikel hervor und exprimieren letztlich das für schnelle Erregungsleitung verantwortliche *Connexin40* (Blaschke et al., 2007; Bakker et al., 2008; Aanhaanen et al., 2009; Zhang et al., 2011a).

Zwei konkurrierende Sichtweisen bemühen sich, dem Mechanismus der Diversifikation des primären Myokards auf den Grund zu gehen. (1) Nach dem Rekrutierungsmodell werden Zellen des Arbeitsmyokards für das Wachstum des initialen Grundgerüsts des Erregungsleitungssystems fortlaufend rekrutiert. Diese Ansicht impliziert eine späte Determinierung, z. T. de novo-Bildung (Purkinjefasern) und mangelnde Proliferationsfähigkeit des Erregungsleitungssystems (Gourdie et al., 1995; Cheng et al., 1999; Gourdie et al., 2003). (2) Das Präspezifikationsmodell steht für eine frühzeitige (Beginn der Expansion der Vor- und Hauptkammern) Festlegung zukünftiger Zellen des Erregungsleitungssystems auf ihr Schicksal gekoppelt mit Wachstum durch (langsame) Proliferation (Moorman et al., 1998; Moorman et al., 2003; Mikawa und Hurtado, 2007).

Nicht nur die frühe Ausprägung der Schrittmacher- und Erregungsleitungsaktivität bereits im geraden Herzschauch spricht gegen das Rekrutierungsmodell. Eine Dedifferenzierung terminal differenzierter Arbeitsmyokardzellen im Rahmen der Rekrutierung erscheint in Anbetracht dessen, dass Zellen des Erregungsleitungssystems die Eigenschaften des primären Myokards konserviert haben, also im Gegensatz zu Zellen des Arbeitsmyokards einen geringeren Grad an Differenzierung/Spezialisierung gemessen am Ausgangszustand aufweisen und selbst zumindest langsam proliferieren, wenig plausibel (Moorman und Christoffels, 2003; Soufan et al., 2006). Dieser Vorgang wurde auch nie nachgewiesen, die Spekulation darüber beruht lediglich auf retrospektiven klonalen Analysen (Gourdie et al., 1995; Cheng et al., 1999).

Die frühe Spezifikation lässt sich also kaum mehr bestreiten. Während sich die Zellen des Erregungsleitungssystems in *Tbx2/3*-positiver Umgebung entwickeln, differenziert sich das Arbeitsmyokard in *Tbx2/3*-negativen Domänen des Herzschauchs. Zellen des Arbeitsmyokards sind nicht in der Lage, in Zellen des Erregungsleitungssystems zu transformieren vice versa. Jedoch können *Tbx2*-exprimierende Zellen (entspricht dem primären Myokard, nicht Erregungsleitungssystem) dem „Erregungsleitungssystem-Programm“ entgehen und in Zellen des Arbeitsmyokards differenzieren, wie es recht ausgeprägt in Ausflusstrakt und Atrioventrikularkanal geschieht (Oosthoek et al., 1998; Rana et al., 2007).

## 4.9 Ausblick

Der Erkenntniszuwachs in der Erforschung der Kardiogenese verzeichnet in den letzten Jahrzehnten, wie auch in anderen Wissenschaftszweigen, ein geradezu exponentielles Wachstum. Mittels moderner analytischer Laborverfahren konnten grundlegende morphogenetische Prozesse der Kardiogenese und daran beteiligte komplexe molekulare Netzwerke weitgehend identifiziert werden. Einige traditionelle Auffassungen haben sich hierbei als überholt erwiesen und mussten neuen Konzepten weichen. Gleichzeitig kommen wir der Entschlüsselung des Zusammenhangs zwischen genetischen Netzwerken auf der einen und morphogenetischen Ereignissen auf der anderen Seite unter Einbeziehung externer Kräfte immer näher.

Jüngere Entdeckungen über den Einfluss von auf Histonmodifizierung basierenden epigenetischen Mechanismen und posttranslationaler Modifikation regulatorischer Proteine durch sogenannte Mikro-RNAs offenbaren eine noch höhere Komplexität der Regulation, versprechen aber auch ein noch tiefer gehendes Verständnis über die Wirkung umweltbedingter und hereditärer Faktoren auf die Entwicklung des Herzens.

Die Hämodynamik ist ein zentraler Einflussfaktor in der Morphogenese des Herzens und repräsentiert die Schwierigkeit einer exakten Differenzierung zwischen dem Wirken „externer“ Kräfte auf die Gentranskription und damit verknüpften morphogenetischen Veränderungen vice versa. Bislang sind die präzisen Auswirkungen Blutfluss-bedingter Kräfte auf genetische „Schaltkreise“ im Herzen nur ansatzweise bekannt. Die immense Bedeutung dieser Thematik lässt jedoch in näherer Zukunft auf einen Durchbruch hoffen.

Für ein Lehrbuch der Embryologie für Studierende wird es kaum möglich sein, diesen enormen Erkenntniszuwachs simpel und verständlich darzubieten, weshalb Lehrwerke, wie der deutsche Klassiker unter den veterinärmedizinischen Lehrbüchern der Embryologie, der „Rüsse und Sinowatz“ (Rüsse und Sinowatz, 1998; 2015), oder auch die englischsprachigen Werke von „Hyttel, Sinowatz und Veijlsted“ (Hyttel, Sinowatz und Veijlsted, 2010) sowie der „McGready“ (McGready et al., 2006), zweifellos insbesondere für den Unterricht der Studierenden sehr wichtig sind.

## 5. Zusammenfassung

### Neue Erkenntnisse der Embryologie zur Entwicklung des Herzens . Eine Literaturstudie

Das Herz entsteht als erstes funktionales Organ im Vertebratenembryo.

Die eminente Bedeutung für Human- und Veterinärmedizin in Verbindung mit sich stetig verbessernden labortechnischen Methoden haben die Erforschung der Genese dieses Organs im Verlauf des letzten Jahrhunderts massiv vorangetrieben.

Gängige Lehrbücher der Veterinärmedizin berücksichtigen zeitgemäße wissenschaftliche Fakten zur Kardiogenese jedoch kaum und verbreiten überholte Paradigmen sowie didaktisch ungeeignetes, gar irreführendes Bildmaterial.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Schwachstellen überlieferter Anschauungen und bietet ein schlüssiges, auf aktuellem Stand der Wissenschaft beruhendes Gesamtkonzept der Kardiogenese, das die Morphogenese im Zusammenhang mit den beteiligten molekularen Regulationsmechanismen erfasst.

Dazu wurde nach der Recherche in elektronischen Datenbanken, Katalogen und Portalen englisch- und deutschsprachige Fachliteratur zu diesem Sachgebiet ausgewertet. Die gesammelten Daten wurden anschließend unter Einbeziehung zahlreicher Abbildungen in einem fortlaufenden Text teils chronologisch, teils systematisch dargestellt.

Nach der Ankunft der aus dem posterioren Epiblasten stammenden kardiovaskulären Vorläuferzellen im Primitivstreifen erfolgt durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Mesp1* die Festlegung auf ein kardiogenes Schicksal sowie die Restriktion ihrer Entwicklungspotenz. Im Zuge der Gastrulation siedeln sie sich im Seitenplattenmesoderm als kardiogenes Mesoderm an. Die *BMP2*-induzierte Expression des Transkriptionsfaktors und „Master-Regulators“ der Kardiogenese, *Nkx2.5*, determiniert die kardiogenen Vorläuferzellen endgültig und leitet die Differenzierung ein.

Nach der Rotation des kardiogenen Mesoderms fusioniert es in der ventralen Mittellinie zum geraden Herzschlauch, der lediglich die Vorläuferzellen des linken Ventrikels enthält. Das weitere Wachstum erfolgt durch die Akquirierung von Vorläuferzellen aus einem Zellpool, der sich vom kranialen zum kaudalen Herzpol über die Dorsalwand der Perikardhöhle erstreckt, dem sogenannten Zweiten Herzfeld. Die Vorläuferzellen des primitiven Herzschlauchs werden demgegenüber als Erstes Herzfeld bezeichnet.

Der bereits vor der Gastrulation am Primitivknoten initiierte Bruch mit der bilateralen Symmetrie des Embryos vollzieht sich auf genetischer Ebene über eine Kaskade, an deren Ende die linksseitige *Pitx2C*-Expression steht. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein entscheidender Regulator der asymmetrischen Morphogenese des Herzens.

Während seiner Elongation rotiert der Herzschlauch in der engen Perikardhöhle entgegen dem Uhrzeigersinn. An der äußeren Krümmung des durch fortgesetztes Wachstum S-förmigen Herzschlauchs wölben sich durch massive Proliferation die atrialen und ventrikulären Regionen hervor. Weitere Konformationsänderungen bringen schließlich die Herzkompartimente in ihre definitiven topographischen Beziehungen zueinander. Die an diesem Prozess beteiligten intrinsischen und extrinsischen Kräfte sind äußerst vielfältig und ihre Verknüpfung miteinander noch unzureichend verstanden.

Das Epikard, die äußere Umhüllung des Herzens, bildet sich während des Loopings aus einer Proliferationszone der kaudalen Wand der Perikardhöhle, die ihren Ursprung im kardiogenen Mesoderm hat. Diese durch frühzeitigen Verlust der *Nkx2.5*-Expression und Expression der Transkriptionsfaktoren *Tbx18* und *WT1* genotypisch einzigartige kardiogene Progenitorpopulation versorgt auch den Sinus venosus mit Vorläuferzellen.

Am Ende des Loopings beginnen die eng miteinander verwobenen Vorgänge der Septierung von Vor- und Hauptkammern, des Atrioventrikularkanal sowie des Ausflusstrakts und der Herzklappenbildung.

Die Vorläuferzellen des Septum interatriale rekrutieren sich via dorsalem Mesokard aus dem Zweiten Herzfeld. Das Septum interventriculare entsteht eher passiv durch die Aneinanderlagerung der fortwährend apikal expandierenden Wände von linkem und rechtem Ventrikel am Sulcus interventricularis. Seine Position wird durch die Grenze zwischen den Expressionsdomänen der Transkriptionsfaktoren *Tbx5* und *Tbx20*, der den linken resp. den rechten Ventrikel spezifiziert, festgelegt.

Mit dem Einsetzen der Septierungsvorgänge in Atrien und Ventrikeln entstehen an den Wänden des Atrioventrikularkanal dorsal und ventral sich gegenüberliegend zwei Endokardkissen. Nach ihrer Fusion zum Septum atrioventriculare bilden rechts- und linksventrikuläre Auswüchse entlang des muskulären Ventrikelseptums die Grundlage für die septalen Klappenblätter der Atrioventrikularklappen. Die wandständigen Klappenblätter entstehen etwas später aus neu gebildeten Endokardkissen im Atrioventrikularkanal. Durch Reorganisation und Kondensation von Zellen der Endokardkissen und des darunterliegenden Myokards sowie des extrazellulären Materials entstehen die reifen Klappenblätter und deren Halteapparat.

Die Semilunarklappen entstehen im Ausflusstrakt analog zu den Atrioventrikularklappen ebenfalls aus zwei Paaren von Endokardkissen, von denen das zuerst erscheinende Endokardkissenpaar auch an der Separierung der Ausflussbahn in Aorta und Truncus pulmonalis beteiligt ist. Aus der Neuralleiste einwandernde Zellen, sog. cardiac neural crest cells, sind unerlässlich sowohl für die Septierung des Ausflusstrakts als auch für die Remodellierung der Semilunarklappen.

Der sich von der Ventrikelbasis bis zur perikardialen Grenze erstreckende embryonale Ausflusstrakt ist hoch dynamisch und versteht sich eher als eine Art Transitzone für Progenitorzellen von Myokard, glatten Muskelzellen sowie kardialen Neuralleistenzellen. Während seine myokardialen Wände zunehmend in den rechten Ventrikel inkorporiert werden und die spiraligen Ausflusstraktkissen sowie die Aortensackprotrusion miteinander fusionieren, migrieren Vorläuferzellen für glatte Muskulatur aus dem Sekundären Herzfeld sowie Neuralleistenzellen ein und bilden die definitiven Gefäßwände für die nachfolgend getrennten Gefäßstämme von Aorta und Truncus pulmonalis. Die definitive Form der sich umeinander windenden Arterienstämme resultiert aus einem Zusammenspiel von Rotation des Ausflusstrakts, asymmetrischer Zellproliferation im Zweiten Herzfeld und Apoptose, was u.a. durch die Wachstumsfaktoren *BMP4* und *FGF8* sowie die Transkriptionsfaktoren *Tbx1* und *Pitx2C* gesteuert wird.

Auch der Einflusstrakt des Herzens ist starken Remodellierungsvorgängen unterworfen. Venae vitellinae, die initial die Hauptzuflüsse zum Herzen sind, und Venae umbilicales unterliegen tierartspezifischen Regressions- bzw. Remodellierungsvorgängen, während die Venae cardinales communes die dominanten Zuflüsse zum Herzen werden. Die myokardiale Umhüllung des Sinus venosus, einer transienten embryonalen Struktur generiert sich, wie auch das Epikard, aus dem Epithel der kaudalen Perikardhöhle mit *Tbx18*- und *WT1*-Signatur. Unter Verlängerung der linken V. cardinalis communis und Inkorporation des rechten Sinushorns verlagern sich die Eintrittsorte der venösen systemischen Zuflüsse schließlich nach rechts.

Die Vena pulmonalis entsteht als endothelialer „Strang“ de novo im dorsalen Mesokard aus *Isl-1*- und *Nkx2.5*-positiven kardiogenen Progenitoren des Zweiten Herzfelds. Ihre originär bilaterale Einmündung in den Einflusstrakt wird im Zuge der Rechtsverlagerung des Sinus venosus in den linken Vorhof transponiert. Die myokardiale Hülle der Vena pulmonalis generiert sich aus nicht-atrialen mesenchymalen Zellen am Übergang zum Atrium, die proliferierend schließlich den gesamten endothelialen „Strang“ umwachsen.

Die starke Expansion von Kompaktmyokard in den apikalen Regionen auf Kosten des ursprünglichen trabekulären Myokards der Ventrikel und Atrien erfordert die Etablierung eines intrinsischen vaskulären Systems.

Die Vorläuferzellen dieses Koronargefäßsystems entspringen der Proepikardialen Serosa, dem Sinus-venosus-Endothel und dem Endokard. Nach der Migration proepikardialer Zellen zur Herzoberfläche und Etablierung der Epikardschicht bilden sich in Folge eines intensiven Signalaustauschs zwischen Epi- und Myokard alsbald zunächst subepikardiale, später intramyokardiale primitive Gefäßgeflechte aus endothelialen Vorläuferzellen. Etwas verzögert werden in mesenchymale Zellen transformierte Epikardzellen akquiriert zum Aufbau von Tunica media und adventitia der Koronargefäße.

Die Fähigkeit aller Kardiomyozyten des primitiven Herzschlauchs, spontan Aktionspotentiale zu erzeugen und diese weiterzuleiten, gründet auf der spezifischen Ausstattung der Zellen mit Ionenkanälen und Gap junctions. Mit der Entstehung des Arbeitsmyokards an der äußeren Krümmung beschränkt sich diese Eigenschaft zunehmend auf die Regionen der inneren Krümmung und des ursprünglichen trabekulären Myokards. Endokardial produzierte Signalmoleküle sind an der Induktion der Expression Schrittmacher-typischer Gene beteiligt.

Der Sinusknoten als dominanter Schrittmacher mit der höchsten Exzitationsrate entwickelt sich aus einer Subdomäne im rechten Teil des Sinus venosus. Die Schrittmacheraktivität beruht auf einem Zusammenspiel zwischen der „internen Kalziumuhr“ und plasmalemalen Ionenkanälen. Der aus dem Myokard des Atrioventrikularkanals entstehende Atrioventrikularknoten verzögert die Impulspropagation von den Atrien zu den Ventrikeln.

Im Gegensatz dazu weisen die ventrikulären Komponenten des Reizleitungssystems, Atrioventrikularbündel, Bündelverzweigungen und Purkinjefasern, die aus dem ursprünglichen, trabekulären Myokard der Ventrikel hervorgehen, eine hohe Leitungsgeschwindigkeit auf.

In dieser Arbeit wurden die neuesten Erkenntnisse zur Kardiogenese bei Vögeln und Säugetieren zusammengetragen. Neben der kritischen Auseinandersetzung mit überholten Konzepten und unzeitgemäßer Nomenklatur, die auch in gegenwärtiger Literatur noch präsent sind, liegt der Schwerpunkt auf der Verknüpfung molekularer Regulationsmechanismen mit spezifischen morphogenetischen Ereignissen. So wird ein wissenschaftlich fundiertes und gleichzeitig übersichtliches und nachvollziehbares Abbild dieser Vorgänge dargelegt. Darüberhinaus werden Ansatzpunkte für weitere Forschungsaktivitäten aufgezeigt.

## 6. Summary

### Novel insights into cardiogenesis - a literature-based study

The heart is the first functional organ being established in the vertebrate embryo.

An enormous significance in the human and veterinary medicine sector in concert with a running improvement of laboratory methods have driven forward intense research in the field of cardiogenesis during the last century.

Current textbooks of veterinary embryology fail to integrate novel findings and tend to adhere to outdated paradigms and unsuitable illustrations. The present work sheds light on the deficits of traditional opinions and constitutes in an understandable manner a contemporary concept of cardiogenesis.

Search for literature was carried out in electronic databases and catalogues, the collected data were evaluated and sorted out. Relevant information was then summarized partly chronologically, partly systematically in a text.

After migration of cardiovascular precursors from the posterior epiblast to the primitive streak lineage restriction occurs via activation of transcription factor *MesP1*. Throughout gastrulation they are located bilaterally in the lateral plate mesoderm as the so-called cardiogenic mesoderm. *BMP2*-induced expression of transcription factor and “master regulator” of cardiogenesis *Nkx2.5* leads to determination and differentiation of cardiogenic progenitors.

After rotation and fusion of the bilateral heart primordia in the ventral midline of the embryo the primitive straight heart tube consists of less more than the precursors of the left ventricle. Growth continues mainly via addition of cells from a second precursor pool, named Second Heart Field, extending from the arterial to the venous heart pole along the dorsal pericardial cavity. In contrast, progenitors of the initial heart tube belong to the First Heart Field.

Being initiated at the primitive streak stage, the break of bilateral symmetry in the embryo starts at the primitive node and is transferred to developing organs by a genetic cascade leading to left-sided *Pitx2C*-expression, a main regulator of asymmetric morphogenesis.

Due to limited space in the pericardial cavity during elongation the cardiac tube starts rotating counterclockwise. At the outer curvature of the late S-shaped heart tube atrial and ventricular chambers start to balloon out. Additional configurational changes bring about the definitive topographical relationship of the cardiac compartments to each other. The intrinsic and extrinsic forces involved in this process are complex and insufficiently understood yet.

The outermost layer of the heart, the epicardium, is generated during looping from a highly proliferative area in the caudal coelomic wall. This so-called proepicardial organ derived from the cardiogenic mesoderm also provides the myocardial precursors of the sinus venosus. It is distinguished from the remainder of the cardiogenic mesoderm by early loss of *Nkx2.5*-expression and is uniquely marked by transcription factors *Tbx18* and *WT1*.

At the end of looping the closely intertwined processes of septation of the cardiac compartments and valvular development begin. The progenitors of the atrial septum are recruited via dorsal mesocardium from the Second Heart Field. By apposition of the facing walls of the centrifugally expanding ventricles the interventricular septum is generated in a passive manner. The border between the expression domains of transcription factors *Tbx5* and *Tbx20*, specifying the left resp. the right ventricle, determines its position.

As septation is initiated endocardial cushions develop at opposing walls dorsally and ventrally in the atrioventricular channel. After fusion their outgrowths on each side of the muscular septum interventriculare gives rise to the septal leaflets of the atrioventricular valves. The mural leaflets form from another set of endocardial cushions in the atrioventricular channel.

The semilunar valves develop analogically to their atrioventricular pendants from two pairs of endocardial cushions and in functional association with the separation of the outflow tract in aorta and pulmonary trunc. Both events depend on the regulatory and physical contribution of an extracardiac progenitor population, the cardiac neural crest cells.

The embryonic outflow tract extending from the base of the ventricles to the border of the pericardial cavity is a highly dynamic transitional zone for progenitors of cardiomyocytes, smooth muscle cells and cardiac neural crest cells. Its initially myocardial wall becomes progressively incorporated into the right ventricle and separation occurs by fusion of the spiralling endocardial cushions and the protrusion from the aortic sac. Smooth muscle cell progenitors from the Second Heart Field and from the neural crest immigrate in order to build up the definitive smooth muscle walls of the newly formed intrapericardial trunks of aorta and pulmonary artery.

At the inflow tract the vitelline veins, initially the dominant systemic tributaries, emerging umbilical veins and cardinal veins undergo intense species-specific remodeling resulting in the common cardinal veins becoming the major inflow route.

Only after ensheathing of the intrapericardial parts of the common cardinal veins with myocardium expressing *Tbx18* and *WT1* from the caudal coelomic wall, this region is named sinus venosus. Elongation of the left common cardinal vein coinciding with incorporation of the right sinus horn into the right atrium leads to the final transposition of the systemic tributaries to the right side.

The pulmonary vein arises as endothelial strand de novo within the dorsal mesocardium from *Isl1*- and *Nkx2.5*-positive Second Heart Field precursors. It enters originally bilateral the inflow, but during rightward shift of the sinus venosus is transposed to the left atrium. At the transition to the left atrium the myocardial sleeve of the pulmonary vein is generated by mesenchymal non-atrial cells, which spread distally over the endothelium.

In order to nourish the massively expanding compact myocardium in the apical regions of atria and ventricles an intrinsic circulation, the coronary vascular system, needs to be developed. The coronary precursor cells are supplied by the proepicardial organ, sinus venosus endothelium and endocardium. Following migration to the heart and establishment of the epicardium, subepicardial, later intramyocardial vascular plexus` are created due to reciprocal signaling between epi- and myocardium, that involves growth factors *FGF2/9*, *VEGFA*, *Ang1/2*. Slightly delayed the Tunica media and Tunica adventitia of the immature vessels are assembled by the acquisition of mesenchymal cells of epicardial origin.

The capability of all primitive cardiomyocytes to generate and conduct electrical impulses is based on specific ion channels and gap junctions in these cells. Being lost in the developing compact myocardium at the outer curvature the restriction of this property to the inner curvature myocardium establishes a scaffold for the development of the cardiac conduction system. The sinus node owing the highest excitation rate develops as dominant pacemaker on the right of the sinus venosus. Pacemaking results from a complex interplay between plasma-lemmal ion channels and the internal “calcium clock”, a calcium release and reuptake mechanism. Arising from the atrioventricular channel`s “primary” myocardium the atrioventricular node delays the impulse propagation from atria to ventricles.

The ventricular components of the conduction system, which develop from the trabecular myocardium, in contrast, display high conduction velocities for efficient and fast activation of the ventricular myocardium.

This literature work was carried out to summarize the recent advances in cardiogenesis research on birds and mammals. Besides the critical consideration of obsolete concepts and inappropriate or outdated nomenclature, the main focus lies on the disclosure of morphogenetic events in association with the underlying molecular regulatory mechanisms. Providing a profound understanding of the theme for students and scientists, it may serve as an initiation point for further studies.

## 7. **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung von Endokard, Myokard und Epikard aus dem Mesoderm
- Abbildung 2: Dreischichtiger Keim nach der Gastrulation
- Abbildung 3: Obsolete Darstellung der Entstehung des geraden Herzschlauchs in Lehrbüchern
- Abbildung 4: Überholte Darstellung des geraden Herzschlauchs mit allen Segmenten des zukünftigen Herzens
- Abbildung 5: Form des Keims bei verschiedenen Amnioten
- Abbildung 6: Gastrulation
- Abbildung 7: Induktion kardiogener Progenitoren
- Abbildung 8: Segregation der kardiogenen Progenitoren im Primitivstreifen
- Abbildung 9: Migration kardiogener Progenitoren
- Abbildung 10: Lage des kardiogenen Mesoderms im mittleren Keimblatt und topographische Beziehung zu benachbarten mesodermalen Populationen
- Abbildung 11: Schematische Darstellung induktiver Einflüsse auf das kardiogene Mesoderm
- Abbildung 12: Räumliche Beziehung zwischen Geweben, die nach der Bildung des perikardalen Zöloms kardiogenese-fördernde und -hemmende Signale produzieren
- Abbildung 13: Schema der drei geläufigsten Herzfelddefinitionen
- Abbildung 14: Lage kardiogener Vorläuferpopulationen nach der Bildung des primitiven Herzschlauchs
- Abbildung 15: Faltung der embryonalen Scheibe bei der Maus
- Abbildung 16A: Fusion der bilateralen Herzfelder beim Huhn
- Abbildung 16B: Fusion des Herzhalbmondes bei der Maus
- Abbildung 17: Meilensteine der frühen Herzentwicklung
- Abbildung 18: Induktion der asymmetrischen Genexpression beim Hühnerembryo ab HH5
- Abbildung 19: Induktion der asymmetrischen Genkaskade im Mäuseembryo ab E6.5
- Abbildung 20: Phasen der Herzschleifenbildung
- Abbildung 21: Rotation des Einflusstrakts
- Abbildung 22: Bildtafel Looping: C-/Dextrallooping beim Huhn, Frühes S-Looping, Spätes S-Looping

- Abbildung 23: Schema des Konzepts der helikalen Verdrehung
- Abbildung 24: Übersichtsschema Herzlooping in der Ventralansicht
- Abbildung 25: Veränderung der Kardiomyozytenmorphologie während des Loopings
- Abbildung 26: Segmentmodell des Herzens
- Abbildung 27: Ballonmodell des Herzens
- Abbildung 28: Entstehung der Proepikardialen Serosa am venösen Herzpol
- Abbildung 29: Migrationsmodi proepikardialer Zellen: beim Huhn (a) und bei der Maus (b)
- Abbildung 30: Kompaktierung der Trabekel
- Abbildung 31: Trabekularisierung, Kompaktierung und Kompaktzonenproliferation in den Ventrikeln
- Abbildung 32: Transkriptionales Profil von Vorhof- und Hauptkammermyokard
- Abbildung 33: Transkriptionale Regulation der kammerspezifischen Genexpression im Wechselspiel mit der des primären Myokards
- Abbildung 34: Bildung der Endokardkissen im Atrioventrikularkanal und epithelio-mesenchymale Transition der Endokardzellen
- Abbildung 35: Regulation der epithelio-mesenchymalen Transition des Endokards
- Abbildung 36: Entstehung von superiorem und inferiorem Endokardkissen
- Abbildung 37: Remodellierung der Endokardkissen und Bildung des Klappenhalteapparats am Beispiel des septalen Blatts der Trikuspidalklappe
- Abbildung 38: Aufbau der Klappenblätter in Abhängigkeit von den hämodynamischen Anforderungen am Beispiel von Schaf und Huhn
- Abbildung 39: Regulation der Stratifizierung der Herzklappen
- Abbildung 40: Konfiguration der Endokardkissen des Ausflusstrakts
- Abbildung 41: Schema der Entstehung der Semilunarklappen
- Abbildung 42: Verankerung und Form der Semilunarklappen
- Abbildung 43: Transkriptionale Domänen in den Atrien
- Abbildung 44: Septierung der Vorhöfe
- Abbildung 45: Remodellierungsvorgänge an der inneren Kurvatur
- Abbildung 46: Konfiguration des Herzens zu Beginn der Ausflusstraktseptierung
- Abbildung 47: Transkriptionale Regulation im Sekundären bzw. Anterioren Herzfeld
- Abbildung 48: Hox-Domänen im Zweiten Herzfeld in Abhängigkeit von der Retinsäure-Konzentration und Beitrag ihrer Vorläuferzellen zum Ausflusstrakt
- Abbildung 49: Remodellierung der Kiemenbogenarterien

- Abbildung 50: Invasion *Isl1*-positiver SHF-Vorläuferzellen in den primitiven myokardialen Ausflusstrakt (AFT) am E10.5
- Abbildung 51: Separierung des distalen Ausflusstrakts beginnend im Aortensack
- Abbildung 52: Reife Lagebeziehung der großen herznahen Arterien zueinander
- Abbildung 53: Herkunft kardialer Neuralleistenzellen vor, während und nach der Faltung der Neuralplatte
- Abbildung 54: Transkriptionale Regulation der Induktion von kardialen Neuralleistenzellen
- Abbildung 55: Migrationsroute der Neuralleistenzellen
- Abbildung 56: Lokalisation der Progenitorzellen des Sinus venosus in den bilateralen Herzfeldern, nach Beginn der Herzschlauchbildung und im geraden Herzschlauch
- Abbildung 57: Entstehung der Venae vitellinae und des mit ihnen in Kontinuität stehenden Herzschlauchs
- Abbildung 58: Regulatorisches Netzwerk im embryonalen Einflusstrakt
- Abbildung 59: Gegenüberstellung des Stammbaumes der Progenitoren des venösen Herzpols, A laut klonaler Analyse, B laut Genexpressionsanalysen
- Abbildung 60: Koronargefäße des Herzens
- Abbildung 61: Multipotenz der „epicardium-derived cells“
- Abbildung 62: Zellteilungsmodi im Epikard
- Abbildung 63: Regulation der epikardialen epithelio-mesenchymalen Transition
- Abbildung 64: Potentielle Quellen koronarer Endothelzellvorläuferzellen
- Abbildung 65: Transkriptionale Regulation von Vaskulogenese und Angiogenese im Herzen
- Abbildung 66: Lokalisation der erregungsleitenden Strukturen im Herzen
- Abbildung 67: Aufbau der Gap junctions
- Abbildung 68: Modelle der Diversifikation der Kardiomyozyten in Arbeitsmyokard und Zellen des Erregungsleitungssystems
- Abbildung 69: Funktionsweise der „Kalzium-Uhr“
- Abbildung 70: Transkriptionales Profil der Komponenten des kardialen Impulsgenerierungs- und Weiterleitungssystems
- Abbildung 71: Hypothese der ontogenetischen vs. der phylogenetischen Entwicklung hämovaskulärer Zellen

## 8. Literaturverzeichnis

- Aanhaanen, W. T. J., Boukens, B. J. D., Sizarov, A., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., van Ginneken, A. C., Moorman, A.F.M., Coronel, R., Christoffels, V. M. (2011). Defective Tbx2-dependent patterning of the atrioventricular canal myocardium causes accessory pathway formation in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 534-544. doi: 10.1172/jci44350
- Aanhaanen, W. T. J., Brons, J. F., Dominguez, J. N., Rana, M. S., Norden, J., Airik, R., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Brown, N.A., Kispert, A., Moorman, A.F.M., Christoffels, V. M. (2009). The Tbx2(+) Primary Myocardium of the Atrioventricular Canal Forms the Atrioventricular Node and the Base of the Left Ventricle. [Article]. *Circulation Research*, 104(11), 1267-U1279. doi: 10.1161/circresaha.108.192450
- Aanhaanen, W. T. J., Mommersteeg, M. T. M., Norden, J., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Anderson, R. H., Kispert, A., Moorman, A.F.M., Christoffels, V. M. (2010). Developmental Origin, Growth, and Three-Dimensional Architecture of the Atrioventricular Conduction Axis of the Mouse Heart. *Circulation Research*, 107(6), 728-U798. doi: 10.1161/circresaha.110.222992
- Abdelwahid, E., Rice, D., Pelliniemi, L. J., & Jokinen, E. (2001). Overlapping and differential localization of Bmp-2, Bmp-4, Msx-2 and apoptosis in the endocardial cushion and adjacent tissues of the developing mouse heart. [Article]. *Cell and Tissue Research*, 305(1), 67-78. doi: 10.1007/s004410100399
- Abu-Issa, R. (2014). Heart Fields: Spatial Polarity and Temporal Dynamics. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 297(2), 175-182. doi: 10.1002/ar.22831
- Abu-Issa, R., & Kirby, M. L. (2007). Heart field: From mesoderm to heart tube. [Review]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 45-68. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123331
- Abu-Issa, R., & Kirby, M. L. (2008). Patterning of the heart field in the chick. [Article]. *Developmental Biology*, 319(2), 223-233. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.04.014
- Abu-Issa, R., Smyth, G., Smoak, I., Yamamura, K., & Meyers, E. N. (2002). Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. [Article]. *Development*, 129(19), 4613-4625.
- Abu-Issa, R., Waldo, K., & Kirby, M. L. (2004). Heart fields: one, two or more? [Review]. *Developmental Biology*, 272(2), 281-285. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.05.016
- Acharya, A., Baek, S. T., Huang, G., Eskiocak, B., Goetsch, S., Sung, C. Y., Banfi, S., Sauer, M.F., Olsen, G.S., Duffield, J.S., Olson, E.N., Tallquist, M. D. (2012). The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development*, 139(12), 2139-2149. doi: 10.1242/dev.079970
- Adams, R. H., Wilkinson, G. A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N. W., Deutsch, U., Risau, W., Klein, R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes & Development*, 13(3), 295-306. doi: 10.1101/gad.13.3.295
- Al Naieb, S., Happel, C. M., & Yelbuz, T. M. (2013). A detailed atlas of chick heart development in vivo. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 195(4), 324-341. doi: <http://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.10.011>
- Alfieri, C. M., Cheek, J., Chakraborty, S., & Yutzey, K. E. (2010). Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. [Article]. *Developmental Biology*, 338(2), 127-135. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.030
- Alsán, B. H., & Schultheiss, T. M. (2002). Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. [Article]. *Development*, 129(8), 1935-1943.

- Ammirabile, G., Tessari, A., Pignataro, V., Szumska, D., Sardo, F. S., Benes, J., Balistreri, M., Bhattacharya, S., Sedmerea, D., Campione, M. (2012). Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. [Article]. *Cardiovascular Research*, 93(2), 291-301. doi: 10.1093/cvr/cvr314
- Anderson, R. H. (2008). The anatomic substrates for abnormal automaticity in the pulmonary veins. [Editorial Material]. *Heart Rhythm*, 5(7), 1068-1069. doi: 10.1016/j.hrthm.2008.04.002
- Anderson, R. H., Becker, A. E., Tranumjensen, J., & Janse, M. J. (1981a). Anatomico-electrophysiological correlations in the conduction system – a review. *British Heart Journal*, 45(1), 67-82.
- Anderson, R. H., Brown, N. A., & Mohun, T. J. (2016a). Insights regarding the normal and abnormal formation of the atrial and ventricular septal structures. *Clinical Anatomy*, 29(3), 290-304. doi: 10.1002/ca.22627
- Anderson, R. H., Brown, N. A., & Moorman, A. F. M. (2006a). Development and structures of the venous pole of the heart. [Review]. *Developmental Dynamics*, 235(1), 2-9. doi: 10.1002/dvdy.20578
- Anderson, R. H., Brown, N. A., & Webb, S. (2002). Development and structure of the atrial septum. [Article]. *Heart*, 88(1), 104-110. doi: 10.1136/heart.88.1.104
- Anderson, R. H., Chaudhry, B., Mohun, T. J., Bamforth, S. D., Hoyland, D., Phillips, H. M., Webb, S., Moorman, A.F.M., Brown, N.A., Henderson, D. J. (2012). Normal and abnormal development of the intrapericardial arterial trunks in humans and mice. [Article]. *Cardiovascular Research*, 95(1), 108-115. doi: 10.1093/cvr/cvs147
- Anderson, R. H., Cook, A., Brown, N. A., Henderson, D. J., Chaudhry, B., & Mohun, T. (2010). Development of the outflow tracts with reference to aortopulmonary windows and aortoventricular tunnels. [Article]. *Cardiology in the Young*, 20, 92-99. doi: 10.1017/s1047951110001137
- Anderson, R. H., Ho, S. Y., Smith, A., & Becker, A. E. (1981b). The internodal atrial myocardium. *Anatomical Record*, 201(1), 75-82. doi: 10.1002/ar.1092010110
- Anderson, R. H., Mohun, T. J., & Brown, N. A. (2015). Clarifying the morphology of the ostium primum defect. *Journal of Anatomy*, 226(3), 244-257. doi: 10.1111/joa.12272
- Anderson, R. H., Mori, S., Spicer, D. E., Brown, N. A., & Mohun, T. J. (2016b). Development and Morphology of the Ventricular Outflow Tracts. *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery*, 7(5), 561-577. doi: 10.1177/2150135116651114
- Anderson, R. H., Spicer, D. E., Brown, N. A., & Mohun, T. J. (2014). The Development of Septation in the Four-Chambered Heart. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 297(8), 1414-1429. doi: 10.1002/ar.22949
- Anderson, R. H., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W., & Moorman, A. (2003a). Development of the heart: (3) Formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. [Editorial Material]. *Heart*, 89(9), 1110-1118. doi: 10.1136/heart.89.9.1110
- Anderson, R. H., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W., & Moorman, A. (2003b). Development of the heart: (2) - Septation of the atriums and ventricles. [Article]. *Heart*, 89(8), 949-958. doi: 10.1136/heart.89.8.949
- Anderson, R. H., Yanni, J., Boyett, M. R., Chandler, N. J., & Dobrzynski, H. (2009). The Anatomy of the Cardiac Conduction System. *Clinical Anatomy*, 22(1), 99-113. doi: 10.1002/ca.20700
- Anderson, R. M., Stottmann, R. W., Choi, M., & Klingensmith, J. (2006b). Endogenous bone morphogenetic protein antagonists regulate mammalian neural crest generation and survival. *Developmental Dynamics*, 235(9), 2507-2520. doi: 10.1002/dvdy.20891
- Ando, K., Takahashi, M., Yamagishi, T., Miyagawa-Tomita, S., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., & Nakajima, Y. (2011). Tenascin C may regulate the recruitment of

- smooth muscle cells during coronary artery development. [Article]. *Differentiation*, 81(5), 299-306. doi: 10.1016/j.diff.2011.03.002
- Ang, S. Y., Uebersohn, A., Spencer, C. I., Huang, Y., Lee, J. E., Ge, K., & Bruneau, B. G. (2016a). KMT2D regulates specific programs in heart development via histone H3 lysine 4 di-methylation. *Development*, 143(5), 810-821. doi: 10.1242/dev.132688
- Ang, Y. S., Rivas, R. N., Ribeiro, A. J. S., Srivas, R., Rivera, J., Stone, N. R., Pratt, K., Mohamed, T.M.A., Fu, J.D., Spencer, C.I., Tippens, N.D., Li, M.L., Narasimha, A., Radzinsky, E., Moon-Grady, A.J., Yu, H.Y., Pruitt, B.L., Snyder, M.P., Srivastava, D. (2016b). Disease Model of GATA4 Mutation Reveals Transcription Factor Cooperativity in Human Cardiogenesis. *Cell*, 167(7), 1734-1749 doi: 10.1016/j.cell.2016.11.033
- Anumonwo, J. M. B., Freeman, L. C., Kwok, W. M., & Kass, R. S. (1992). Delayed rectification in single cells isolated from guinea-pig sinoatrial node. *American Journal of Physiology*, 262(3), H921-H925.
- Anumonwo, J. M. B., Tallini, Y. N., Vetter, F. J., & Jalife, J. (2001). Action potential characteristics and arrhythmogenic properties of the cardiac conduction system of the murine heart. *Circulation Research*, 89(4), 329-335. doi: 10.1161/hh1601.095894
- Arguello, C., Delacruz, M. V., & Sanchez, C. (1978). Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. [Article]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 10(4), 307-310. doi: 10.1016/0022-2828(78)90380-2
- Arguello, C., Delacruz, M. V., & Sanchezgomez, C. (1975). Experimental study of formation of heart tube in chick embryo. [Article]. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 33(FEB), 1-11.
- Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., Asai, R., Seya, D., Minoux, M., Rijli, F. M., Nishiyama, K., Kim, K. S., Uchijima, Y., Ogawa, H., Kurihara, Y., Kurihara, H. (2012). Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nature Communications*, 3:1267 doi: 10.1038/ncomms2258
- Arita, Y., Nakaoka, Y., Matsunaga, T., Kidoya, H., Yamamizu, K., Arima, Y., Kataoka-Hashimoto, T., Ikeoka, K., Yasui, T., Masaki, T., Yamamoto, K., Higuchi, K., Park, J. S., Shirai, M., Nishiyama, K., Yamagishi, H., Otsu, K., Kurihara, H., Minami, T., Yamauchi, Takihara, K., Koh, G. Y., Mochizuki, N., Takakura, N., Sakata, Y., Yamashita, J. K., Komuro, I. (2014). Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. *Nature Communications*, 5:4552 doi: 10.1038/ncomms5552
- Armulik, A., Genove, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell*, 21(2), 193-215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001
- Arnold, S. J., Hofmann, U. K., Bikoff, E. K., & Robertson, E. J. (2008). Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. *Development*, 135(3), 501-511. doi: 10.1242/dev.014357
- Arnold, S. J., & Robertson, E. J. (2009). Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 91-103. doi: 10.1038/nrm2618
- Arrechedera, H., Strauss, M., Argüello, C., Ayesta, C., & Anselmi, G. (1984). Ultrastructural study of the myocardial wall of the atrio-ventricular canal during the development of the embryonic chick heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 16(10), 885-895. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2828(84)80025-5
- Aschoff, L. (1910). Referat über die Herzstörungen in ihren Beziehungen zu den Spezifischen Muskelsystem des Herzens. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für*

- Ashe, H. L., & Briscoe, J. (2006). The interpretation of morphogen gradients. [Review]. *Development, 133*(3), 385-394. doi: 10.1242/dev.02238
- Ashraf, H., Pradhan, L., Chang, E. I., Terada, R., Ryan, N. J., Briggs, L. E., Chowdhury, R., Zarate, M.A., Sugi, Y., Nam, H.J., Benson, D.W., Anderson, R.H., Kasahara, H. (2014). A Mouse Model of Human Congenital Heart Disease High Incidence of Diverse Cardiac Anomalies and Ventricular Noncompaction Produced by Heterozygous Nkx2-5 Homeodomain Missense Mutation. *Circulation-Cardiovascular Genetics, 7*(4), 423-467. doi: 10.1161/circgenetics.113.000281
- Astrof, S., Crowley, D., & Hynes, R. O. (2007). Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Developmental Biology, 311*(1), 11-24. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.07.005
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10*(3), 165-177. doi: 10.1038/nrm2639
- Auman, H. J., Coleman, H., Riley, H. E., Olale, F., Tsai, H. J., & Yelon, D. (2007). Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes. [Article]. *Plos Biology, 5*(3): e53, 604-615. doi: e5310.1371/journal.pbio.0050053
- Aw, S., Adams, D. S., Qiu, D. Y., & Levin, M. (2008). H,K-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry. *Mechanisms of Development, 125*(3-4), 353-372. doi: 10.1016/j.mod.2007.10.011
- Azambuja, A. P., Portillo-Sanchez, V., Rodrigues, M. V., Omae, S. V., Schechtman, D., Strauss, B. E., Constanzi-Strauss, E., Krieger, J.E., Perez-Pomares, J.M., Xavier-Neto, J. (2010). Retinoic Acid and VEGF Delay Smooth Muscle Relative to Endothelial Differentiation to Coordinate Inner and Outer Coronary Vessel Wall Morphogenesis. *Circulation Research, 107*(2), 204-U287. doi: 10.1161/circresaha.109.214650
- Azhar, M., Brown, K., Gard, C., Chen, H., Rajan, S., Elliott, D. A., Stevens, M.V., Camenisch, T.D., Conway, S.J., Doetschman, T. (2011). Transforming Growth Factor Beta2 Is Required for Valve Remodeling During Heart Development. [Article]. *Developmental Dynamics, 240*(9), 2127-2141. doi: 10.1002/dvdy.22702
- Azhar, M., Runyan, R. B., Gard, C., Sanford, L. P., Miller, M. L., Andringa, A., Pawlowski, S., Rajan, S., Doetschman, T. (2009). Ligand-Specific Function of Transforming Growth Factor Beta in Epithelial-Mesenchymal Transition in Heart Development. [Article]. *Developmental Dynamics, 238*(2), 431-442. doi: 10.1002/dvdy.21854
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J. A., Anderson, R. M., May, S. R., McMahon, J.A., Harland, R.M., Rossant, J., De Robertis, E. M. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature, 403*(6770), 658-661.
- Baek, S. H., Kioussi, C., Briata, P., Wang, D. G., Nguyen, H. D., Ohgi, K. A., Glass, C.K., Wynshaw-Boris, A., Rose, D.W., Rosenfeld, M. G. (2003). Regulated subset of G(1) growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100*(6), 3245-3250. doi: 10.1073/pnas.0330217100
- Baik, J., Magli, A., Tahara, N., Swanson, S. A., Koyano-Nakagawa, N., Borges, L., Stewart, R., Garry, D.J., Kawakami, Y., Thomson, J.A., Perlingeiro, R. C. R. (2016). Endoglin integrates BMP and Wnt signalling to induce haematopoiesis through JDP2. *Nature Communications, 7*. doi: 10.1038/ncomms13101
- Bajolle, F., Zaffran, S., Kelly, R. G., Hadchouel, J., Bonnet, D., Brown, N. A., & Buckingham, M. E. (2006). Rotation of the myocardial wall of the outflow tract is implicated in the normal positioning of the great arteries. [Article]. *Circulation*

- Research*, 98(3), 421-428. doi: 10.1161/01.RES.0000202800.85341.6e
- Bajolle, F., Zaffran, S., Meilhac, S. M., Dandonneau, M., Chang, T., Kelly, R. G., & Buckingham, M. E. (2008). Myocardium at the base of the aorta and pulmonary trunk is prefigured in the outflow tract of the heart and in subdomains of the second heart field. [Article]. *Developmental Biology*, 313(1), 25-34. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.023
- Bakker, M. L., Boink, G. J. J., Boukens, B. J., Verkerk, A. O., van den Boogaard, M., den Haan, A. D., Hoogaars, W.M.H., Buermans, H.P., de Bakker, J.M.T., Seppen, J., Tan, H.L., Moorman, A.F.M., t Hoen, P.A.C., Christoffels, V. M. (2012). T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. [Article]. *Cardiovascular Research*, 94(3), 439-449. doi: 10.1093/cvr/cvs120
- Bakker, M. L., Boukens, B. J., Mommersteeg, M. T. M., Brons, J. F., Wakker, V., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2008). Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. [Article]. *Circulation Research*, 102(11), 1340-1349. doi: 10.1161/circresaha.107.169565
- Bakker, M. L., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. M. (2010a). The Cardiac Pacemaker and Conduction System Develops From Embryonic Myocardium that Retains Its Primitive Phenotype. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 56(1), 6-15. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181e775d3
- Bakker, M. L., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2010b). The Atrioventricular Node: Origin, Development, and Genetic Program. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 20(5), 164-171.
- Baldwin, H. S., & Solorsh, M. (1989). Degradation of hyaluronic acid does not prevent looping of the mammalian heart in situ. *Developmental Biology*, 136(2), 555-559. doi: 10.1016/0012-1606(89)90281-9
- Balza, R. O., & Misra, R. P. (2006). Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6498-6510. doi: 10.1074/jbc.M509487200
- Bamforth, S. D., Chaudhry, B., Bennett, M., Wilson, R., Mohun, T. J., Van Mierop, L. H. S., Henderson, D.J., Anderson, R. H. (2013). Clarification of the identity of the mammalian fifth pharyngeal arch artery. [Article]. *Clinical Anatomy*, 26(2), 173-182. doi: 10.1002/ca.22101
- Bao, Z. Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E., & Cepko, C. L. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. [Article]. *Science*, 283(5405), 1161-1164. doi: 10.1126/science.283.5405.1161
- Barbuti, A., Terragni, B., Brioschi, C., & DiFrancesco, D. (2007). Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta(2)-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(1), 71-78. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.09.018
- Barron, M., Gao, M., & Lough, J. (2000). Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. [Article]. *Developmental Dynamics*, 218(2), 383-393.
- Barron, M. R., Belaguli, N. S., Zhang, S. X., Trinh, M., Iyer, D., Merlo, X., Lough, J.W., Parmacek, M.S., Bruneau, B.G., Schwartz, R. J. (2005). Serum response factor, an enriched cardiac mesoderm obligatory factor, is a downstream gene target for Tbx genes. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11816-11828. doi: 10.1074/jbc.M412408200
- Bartram, U., Molin, D. G. M., Wisse, L. J., Mohamad, A., Sanford, L. P., Doetschman, T., Speer, C.P., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A. C. (2001). Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-

- knockout mice. [Article]. *Circulation*, 103(22), 2745-2752.
- Basch, M. L., Bronner-Fraser, M., & Garcia-Castro, M. I. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature*, 441(7090), 218-222. doi: 10.1038/nature04684
- Bayraktar, M., & Manner, J. (2014). Cardiac looping may be driven by compressive loads resulting from unequal growth of the heart and pericardial cavity. Observations on a physical simulation model. *Frontiers in Physiology*, 5: 112 doi: 10.3389/fphys.2014.00112
- Becker, J. R., Chatterjee, S., Robinson, T. Y., Bennett, J. S., Panakova, D., Galindo, C. L., Zhong, L., Shin, J.T., Coy, S.M., Kelly, A.E., Roden, D.M., Lim, C.C., MacRae, C. A. (2014). Differential activation of natriuretic peptide receptors modulates cardiomyocyte proliferation during development. *Development*, 141(2), 335-345. doi: 10.1242/dev.100370
- Benninghoff, A. (1923). Beziehungen des Reizleitungssystems und der Papillarmuskeln zu den Konturfasern des Herzschlauches. [Article]. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, 57, 185-208.
- Berdougo, E., Coleman, H., Lee, D. H., Stainier, D. Y. R., & Yelon, D. (2003). Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development*, 130(24), 6121-6129. doi: 10.1242/dev.00838
- Berggren, K., McCaffery, P., Drager, U., & Forehand, C. J. (1999). Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, RALDH-2. [Article]. *Developmental Biology*, 210(2), 288-304.
- Bertocchini, F., Skromne, I., Wolpert, L., & Stern, C. D. (2004). Determination of embryonic polarity in a regulative system: evidence for endogenous inhibitors acting sequentially during primitive streak formation in the chick embryo. *Development*, 131(14), 3381-3390. doi: 10.1242/dev.01178
- Bertrand, N., Roux, M., Ryckebusch, L., Niederreither, K., Dolle, P., Moon, A., Capecchi, M., Zaffran, S. (2011). Hox genes define distinct progenitor sub-domains within the second heart field. [Article]. *Developmental Biology*, 353(2), 266-274. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.02.029
- Bharadwaj, K. N., Spitz, C., Shekhar, A., Yalcin, H. C., & Butcher, J. T. (2012). Computational Fluid Dynamics of Developing Avian Outflow Tract Heart Valves. [Article]. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(10), 2212-2227. doi: 10.1007/s10439-012-0574-8
- Bi, W. Z., Drake, C. J., & Schwarz, J. J. (1999). The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Developmental Biology*, 211(2), 255-267. doi: 10.1006/dbio.1999.9307
- Biben, C., & Harvey, R. P. (1997). Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. [Article]. *Genes & Development*, 11(11), 1357-1369.
- Bimber, B., Dettman, R. W., & Simon, H. G. (2007). Differential regulation of Tbx5 protein expression and sub-cellular localization during heart development. [Article]. *Developmental Biology*, 302(1), 230-242. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.023
- Blaschke, R. J., Hahurij, N. D., Kuijper, S., Just, S., Wisse, L. J., Deissler, K., . . . Groot, A. (2007). Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation*, 115(14), 1830-1838. doi: 10.1161/circulationaha.106.637819
- Bleeker, W. K., Mackaay, A. J. C., Massonpevet, M., Bouman, L. N., & Becker, A. E. (1980). Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circulation*

- Research*, 46(1), 11-22.
- Bleyl, S. B., Saijoh, Y., Bax, N. A. M., Gittenberger-de Groot, A. C., Wisse, L. J., Chapman, S. C., Hunter, J., Shiratori, H., Hamada, H., Yamada, S., Shiota, K., Klewer, S.E., Leppert, M.F., Schoenwolf, G. C. (2010). Dysregulation of the PDGFRA gene causes inflow tract anomalies including TAPVR: integrating evidence from human genetics and model organisms. [Article]. *Human Molecular Genetics*, 19(7), 1286-1301. doi: 10.1093/hmg/ddq005
- Blom, N. A., Gittenberger-de Groot, A. C., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., Mentink, M. M. T., & Ottenkamp, J. (1999). Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using HNK-1 antigen expression - Possible relevance for understanding of abnormal atrial automaticity. *Circulation*, 99(6), 800-806.
- Blom, N. A., Gittenberger-de Groot, A. C., Jongeneel, T. H., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., & Ottenkamp, J. (2001). Normal development of the pulmonary veins in human embryos and formulation at a morphogenetic concept for sinus venosus defects. *American Journal of Cardiology*, 87(3), 305-309. doi: 10.1016/s0002-9149(00)01363-1
- Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., Bogusch, S., Beyer, T., van Straaten, H.W.M., Viebahn, C. (2007). Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation*, 75(2), 133-146. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00124.x
- Blum, M., Weber, T., Beyer, T., & Vick, P. (2009). Evolution of leftward flow. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(4), 464-471. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.11.005
- Bodmer, R. (1995). Heart development in Drosophila and its relationship to vertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 5(1), 21-28. doi: 10.1016/1050-1738(94)00032-q
- Bodmer, R., & Frasch, M. (2010). Development and aging of the Drosophila heart. *Heart Development and Regeneration*, 2, 47-86.
- Boettger, T., Wittler, L., & Kessel, M. (1999). FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. [Article]. *Current Biology*, 9(5), 277-280. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80119-5
- Bogdanov, K. Y., Vinogradova, T. M., & Lakatta, E. G. (2001). Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger - Molecular partners in pacemaker regulation. *Circulation Research*, 88(12), 1254-1258. doi: 10.1161/hh1201.092095
- Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Lacovino, M., Kyba, M., & Blanpain, C. (2008). Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*, 3(1), 69-84. doi: 10.1016/j.stem.2008.06.009
- Borg, T. K., Rubin, K., Carver, W., Samarel, A., & Terracio, L. (1996). The cell biology of the cardiac interstitium. [Article]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 6(2), 65-70.
- Bouman, H. G. A., Broekhuizen, M. L. A., Baasten, A. M. J., GittenbergerDeGroot, A. C., & Wenink, A. C. G. (1997). Morphological and stereological study of changes in the embryonic chicken heart after retinoic acid treatment. *European Journal of Morphology*, 35(1), 45-46.
- Bouman, H. G. A., Broekhuizen, M. L. A., Mieke, A., Baasten, J., Gittenbergerdegroot, A. C., & Wenink, A. C. G. (1995). Spectrum of looping disturbances in stage 34 chicken hearts after retinoic acid treatment. *Anatomical Record*, 243(1), 101-108. doi: 10.1002/ar.1092430112
- Boyer, A. S., Ayerinkas, I. I., Vincent, E. B., McKinney, L. A., Weeks, D. L., & Runyan, R. B. (1999). TGFβ2 and TGFβ3 Have Separate and Sequential Activities during Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart. *Developmental Biology*, 208(2), 530-545. doi: http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1999.9211
- Boyett, M. R., Honjo, H., & Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular Research*, 47(4), 658-687. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00135-8

- Boyett, M. R., Inada, S., Yoo, S., Li, J., Liu, J., Tellez, J., Greener, I.D., Honjo, H., Billeter, R., Lei, M., Zhang, H., Efimov, I.R., Dobrzynski, H. (2006). Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Cardiovascular Gap Junctions*, 42, 175-197.
- Braitsch, C. M., Combs, M. D., Quaggin, S. E., & Yutzey, K. E. (2012). Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Developmental Biology*, 368(2), 345-357. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.002>
- Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. [Review]. *Developmental Biology*, 258(1), 1-19. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00112-x
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O., Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*, 128(8), 1253-1264.
- Brennan, J., Lu, C. C., Norris, D. P., Rodriguez, T. A., Beddington, R. S. P., & Robertson, E. J. (2001). Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature*, 411(6840), 965-969. doi: 10.1038/35082103
- Brennan, J., Norris, D. P., & Robertson, E. J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. [Article]. *Genes & Development*, 16(18), 2339-2344. doi: 10.1101/gad.1016202
- Bressan, M., Liu, G., & Mikawa, T. (2013). Early Mesodermal Cues Assign Avian Cardiac Pacemaker Fate Potential in a Tertiary Heart Field. *Science*, 340(6133), 744-748. doi: 10.1126/science.1232877
- Bressan, M. C., Louie, J. D., & Mikawa, T. (2014). Hemodynamic Forces Regulate Developmental Patterning of Atrial Conduction. *PLoS One*, 9(12): e115207 doi: 10.1371/journal.pone.0115207
- Briggs, L. E., Kakarla, J., & Wessels, A. (2012). The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion. [Review]. *Differentiation*, 84(1), 117-130 doi: 10.1016/j.diff.2012.05.006
- Brown, C. B., Feiner, L., Lu, M. M., Li, J., Ma, X. K., Webber, A. L., Jia, L., Raper, J.A., Epstein, J. A. (2001). PlexinA2 and semaphorin signaling during cardiac neural crest development. *Development*, 128(16), 3071-3080.
- Brown, C. B., Wenning, J. M., Lu, M. M., Epstein, D. J., Meyers, E. N., & Epstein, J. A. (2004). Cre-mediated excision of Fgf8 in the Tbx1 expression domain reveals a critical role for Fgf8 in cardiovascular development in the mouse. [Article]. *Developmental Biology*, 267(1), 190-202. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.024
- Brown, H. F., Difrancesco, D., & Noble, S. J. (1979). Adrenaline action on rabbit sino-atrial node. *Journal of Physiology-London*, 290(MAY), 31-32.
- Bruneau, B. G. (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, 451(7181), 943-948. doi: 10.1038/nature06801
- Bruneau, B. G., Bao, Z. Z., Fatkin, D., Xavier-Neto, J., Georgakopoulos, D., Maguire, C. T., Berul, C.I., Kass, D.A., Kuroski-de Bold, M.L., de Bold, A.J., Conner, D.A., Rosenthal, N., Cepko, C.L., Seidman, C.E., Seidman, J. G. (2001a). Cardiomyopathy in Irx4-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. [Article]. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1730-1736. doi: 10.1128/mcb.21.5.1730-1736.2001
- Bruneau, B. G., Bao, Z. Z., Tanaka, M., Schott, J. J., Izumo, S., Cepko, C. L., Seidman, J.G., Seidman, C. E. (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene Irx4 is modulated by Nkx2-5 and dHand. [Article]. *Developmental Biology*, 217(2), 266-277. doi: 10.1006/dbio.1999.9548
- Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner,

- D.A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C.E., Seidman, J. G. (2001b). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. [Article]. *Cell*, 106(6), 709-721.
- Bruneau, B. G., Xavier-Neto, J., Seidman, J. G., Rosenthal, N., & Seidman, C. E. (1999). Retinoic acid regulates antero-posterior patterning of the chamber-specific transcription factors lrx4 and Tbx5 in the developing mouse heart. [Meeting Abstract]. *Circulation*, 100(18), 348-348.
- Buckingham, M., Meilhac, S., & Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. [Review]. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 826-835. doi: 10.1038/nrg1710
- Burns, T., Yang, Y., Hiriart, E., & Wessels, A. (2016). The Dorsal Mesenchymal Protrusion and the Pathogenesis of Atrioventricular Septal Defects. *Journal of cardiovascular development and disease*, 3(4), 29 doi: 10.3390/jcdd3040029
- Bussmann, J., Bakkers, J., & Schulte-Merker, S. (2007). Early endocardial morphogenesis requires Scf/Tal1. *Plos Genetics*, 3(8), 1425-1437. doi: 10.1371/journal.pgen.0030140
- Butcher, J. T., McQuinn, T. C., Sedmera, D., Turner, D., & Markwald, R. R. (2007a). Transitions in early embryonic atrioventricular valvular function correspond with changes in cushion biomechanics that are predictable by tissue composition. *Circulation Research*, 100(10), 1503-1511. doi: 10.1161/circresaha.107.148684
- Butcher, J. T., Norris, R. A., Hoffman, S., Mjaatvedt, C. H., & Markwald, R. R. (2007b). Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase. [Article]. *Developmental Biology*, 302(1), 256-266. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.048
- Butler, J. K. (1952). An experimental analysis of cardiac loop formation in the chick. *Austin, Texas*, University of Texas MA thesis.
- Cai, C. L., Liang, X. Q., Shi, Y. Q., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. [Article]. *Developmental Cell*, 5(6), 877-889.
- Cai, C. L., Martin, J. C., Sun, Y. F., Cui, L., Wang, L. C., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X.Q., Zhang, X.X., Stallcup, W.B., Denton, C.P., McCulloch, A., Chen, J., Evans, S. M. (2008). A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. [Article]. *Nature*, 454(7200), 104-U104. doi: 10.1038/nature06969
- Cai, X., Nomura-Kitabayashi, A., Cai, W., Yan, J., Christoffels, V. M., & Cai, C. L. (2011). Myocardial Tbx20 regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via Bmp2. [Research Support, N I H , Extramural Research Support, Non-U S Gov't]. *Developmental Biology*, 360(2), 381-390.
- Cai, X. Q., Zhang, W. J., Hu, J., Zhang, L., Sultana, N., Wu, B. R., Cai, W.B., Zhou, B., Cai, C. L. (2013). Tbx20 acts upstream of Wnt signaling to regulate endocardial cushion formation and valve remodeling during mouse cardiogenesis. *Development*, 140(15), 3176-3187. doi: 10.1242/dev.092502
- Cambier, L., Plate, M., Sucov, H. M., & Pashmforoush, M. (2014). Nkx2-5 regulates cardiac growth through modulation of Wnt signaling by R-spondin3. *Development*, 141(15), 2959-2971. doi: 10.1242/dev.103416
- Camelliti, P., Green, C. R., LeGrice, I., & Kohl, P. (2004). Fibroblast network in rabbit sinoatrial node - Structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circulation Research*, 94(6), 828-835. doi: 10.1161/01.res.0000122382.19400.14
- Camp, E., Dietrich, S., & Munsterberg, A. (2012). Fate Mapping Identifies the Origin of SHF/AHF Progenitors in the Chick Primitive Streak. [Article]. *PLoS One*, 7(12): e51948 doi: 10.1371/journal.pone.0051948
- Campione, M., & Franco, D. (2016). Current Perspectives in Cardiac Laterality. *Journal of*

- cardiovascular development and disease*, 3(4), 34.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., Blum, M. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development*, 126(6), 1225-1234.
- Canale ED, C. G., Smolich JJ and Campbell JH. (1986). *Cardiac muscle*. Berlin: Springer-Verlag, 1986, 1-318
- Cano, E., Carmona, R., Velecela, V., Martinez-Estrada, O., & Munoz-Chapuli, R. (2015). The proepicardium keeps a potential for glomerular marker expression which supports its evolutionary origin from the pronephros. *Evolution & Development*, 17(4), 224-230. doi: 10.1111/ede.12130
- Captur, G., Wilson, R., Bennett, M. F., Luxan, G., Nasis, A., de la Pompa, J. L., Moon, J.C., Mohun, T. J. (2016). Morphogenesis of myocardial trabeculae in the mouse embryo. *Journal of Anatomy*, 229(2), 314-325. doi: 10.1111/joa.12465
- Caputo, L., Witzel, H. R., Kolovos, P., Cheedipudi, S., Looso, M., Mylona, A., van Ijcken, W.F.J., Laugwitz, K.L., Evans, S.M., Braun, T., Soler, E., Grosveld, F., Dobрева, G. (2015). The *Isl1/Ldb1* Complex Orchestrates Genome-wide Chromatin Organization to Instruct Differentiation of Multipotent Cardiac Progenitors. *Cell Stem Cell*, 17(3), 287-299. doi: 10.1016/j.stem.2015.08.007
- Castro-Quezada, A., Nadal-Ginard, B., & de la Cruz, M. V. (1972). Experimental study of the formation of the bulboventricular loop in the chick. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 27(3), 623-637.
- Cavallero, S., Shen, H., Yi, C., Lien, C. L., Kumar, S. R., & Sucov, H. M. (2015). CXCL12 Signaling Is Essential for Maturation of the Ventricular Coronary Endothelial Plexus and Establishment of Functional Coronary Circulation. *Developmental Cell*, 33(4), 469-477. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.018
- Chakraborty, S., Cheek, J., Sakthivel, B., Aronow, B. J., & Yutzey, K. E. (2008). Shared gene expression profiles in developing heart valves and osteoblast progenitor cells. [Article]. *Physiological Genomics*, 35(1), 75-85. doi: 10.1152/physiolgenomics.90212.2008
- Chamberlain, A. A., Lin, M. Y., Lister, R. L., Maslov, A. A., Wang, Y. D., Suzuki, M., Wu, B.R., Grealley, J.M., Zheng, D.Y., Zhou, B. (2014). DNA Methylation is Developmentally Regulated for Genes Essential for Cardiogenesis. *Journal of the American Heart Association*, 3(3), e000976 doi: 10.1161/jaha.114.000976
- Chan, S. S. K., Shi, X. Z., Toyama, A., Arpke, R. W., Dandapat, A., Iacovino, M., Kang, J., Le, G., Hagen, H.R., Garry, D.J., Kyba, M. (2013). *Mesp1* Patterns Mesoderm into Cardiac, Hematopoietic, or Skeletal Myogenic Progenitors in a Context-Dependent Manner. *Cell Stem Cell*, 12(5), 587-601. doi: 10.1016/j.stem.2013.03.004
- Chan, S. S.-K., Hagen, H. R., Swanson, S. A., Stewart, R., Boll, K. A., Aho, J., Thomson, J.A., Kyba, M. (2016). Development of Bipotent Cardiac/Skeletal Myogenic Progenitors from *MESP1*+Mesoderm. *Stem Cell Reports*, 6(1), 26-34. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.003
- Chang, A. C. Y., Fu, Y. X., Garside, V. C., Niessen, K., Chang, L., Fuller, M., Setiadi, A., Smrz, J., Kyle, A., Minchinton, A., Marra, M., Hoodless, P.A., Karsan, A. (2011). Notch Initiates the Endothelial-to-Mesenchymal Transition in the Atrioventricular Canal through Autocrine Activation of Soluble Guanylyl Cyclase. *Developmental Cell*, 21(2), 288-300. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.022
- Chang, C. P., & Bruneau, B. G. (2012). Epigenetics and Cardiovascular Development. In D. Julius & D. E. Clapham (Eds.), *Annual Review of Physiology*, 74, 41-68.
- Chang, C. P., Neilson, J. R., Bayle, J. H., Gestwicki, J. E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I.A., Crabtree, G. R. (2004). A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell*, 118(5), 649-663. doi:

10.1016/j.cell.2004.08.010

- Chang, C. P., Stankunas, K., Shang, C., Kao, S. C., Twu, K. Y., & Cleary, M. L. (2008). Pbx1 functions in distinct regulatory networks to pattern the great arteries and cardiac outflow tract. *Development*, *135*(21), 3577-3586. doi: 10.1242/dev.022350
- Chen, H. I., Poduri, A., Numi, H., Kivela, R., Saharinen, P., McKay, A. S., Raftrey, B., Churko, J., Tian, X.Y., Zhou, B., Alitalo, K., Red-Horse, K. (2014a). VEGF-C and aortic cardiomyocytes guide coronary artery stem development. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(11), 4899-4914. doi: 10.1172/jci77483
- Chen, H. I., Sharma, B., Akerberg, B. N., Numi, H. J., Kivela, R., Saharinen, P., Aghajanian, H., McKay, A.S., Bogard, P.E., Chang, A.H., Jacobs, A.H., Epstein, J.A., Stankunas, K., Alitalo, K., Red-Horse, K. (2014b). The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis. *Development*, *141*(23), 4500-4512. doi: 10.1242/dev.113639
- Chen, H. Y., Shi, S., Acosta, L., Li, W. M., Lu, J., Bao, S. D., Chen, Z.A., Yang, Z.C., Schneider, M.D., Chien, K.R., Conway, S.J., Yoder, M.C., Haneline, L.S., Franco, D., Shou, W. N. (2004). BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*, *131*(9), 2219-2231. doi: 10.1242/dev.01094
- Chen, L., Fulcoli, F. G., Tang, S., & Baldini, A. (2009). Tbx1 Regulates Proliferation and Differentiation of Multipotent Heart Progenitors. [Review]. *Circulation Research*, *105*(9), 842-U838. doi: 10.1161/circresaha.109.200295
- Chen, Q., Zhang, H., Liu, Y., Adams, S., Eilken, H., Stehling, M., Corada, M., Dejana, E., Zhou, B., Adams, R. H. (2016). Endothelial cells are progenitors of cardiac pericytes and vascular smooth muscle cells. *Nature Communications*, *7*: 12422. doi: 10.1038/ncomms12422
- Chen, W. C., Zhang, Y., Ma, D., Ma, X. J., Shou, W. N., & Huang, G. Y. (2012). Bmp2 regulates the interaction between EPDCs and myocytes in cardiac OFT. [Article]. *Medical Hypotheses*, *79*(2), 174-177. doi: 10.1016/j.mehy.2012.04.027
- Chen, Y. H., Ishii, M., Sucov, H. M., & Maxson, R. E. (2008). Msx1 and Msx2 are required for endothelial-mesenchymal transformation of the atrioventricular cushions and patterning of the atrioventricular myocardium. [Article]. *Bmc Developmental Biology*, *8*: 75 doi: 10.1186/1471-213x-8-75
- Cheng, G., Lichenberg, W. H., Cole, G. J., Mikawa, T., Thompson, R. P., & Gourdie, R. G. (1999). Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development*, *126*(22), 5041-5049.
- Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., & Briscoe, J. (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental Cell*, *8*(2), 179-192. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.010
- Chiapparo, G., Lin, X. H., Lescroart, F., Chabab, S., Paulissen, C., Pitisci, L., Bondue, A., Blanpain, C. (2016). Mesp1 controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. *Journal of Cell Biology*, *213*(4), 463-477. doi: 10.1083/jcb.201505082
- Chien, K. R., Knowlton, K. U., Zhu, H., & Chien, S. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy - molecular studies of an adaptive physiological response. [Article]. *Faseb Journal*, *5*(15), 3037-3046.
- Chintalgattu, V., Nair, D. M., & Katwa, L. C. (2003). Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *35*(3), 277-286. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00006-3
- Chiplunkar, A. R., Lung, T. K., Alhashem, Y., Koppenhaver, B. A., Salloum, F. N., Kukreja, R. C., Haar, J.L., Lloyd, J. A. (2013). Kruppel-Like Factor 2 is required for normal mouse cardiac development. [Article]. *PLoS One*, *8*(2): e54891 doi: 10.1371/journal.pone.0054891

- Cho, C. H., Kim, S. S., Jeong, M. J., Lee, C. O., & Shin, H. S. (2000). The Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for embryonic heart development in mice. [Article]. *Molecules and Cells*, 10(6), 712-722.
- Cho, H. S., Takano, M., & Noma, A. (2003). The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *Journal of Physiology-London*, 550(1), 169-180. doi: 10.1113/jphysiol.2003.040501
- Christoffels, V. M., Grieskamp, T., Norden, J., Mommersteeg, M. T. M., Rudat, C., & Kispert, A. (2009). Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. [Letter]. *Nature*, 458(7240), E8-E9. doi: 10.1038/nature07916
- Christoffels, V. M., Habets, P., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W. H., Bao, Z.Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R.P., Moorman, A. F. M. (2000a). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Developmental Biology*, 223(2), 266-278. doi: 10.1006/dbio.2000.9753
- Christoffels, V. M., Hoogaars, W. M. H., Tessari, A., Clout, D. E. W., Moorman, A. F. M., & Campione, M. (2004). T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. [Article]. *Developmental Dynamics*, 229(4), 763-770. doi: 10.1002/dvdy.10487
- Christoffels, V. M., Keijser, A. G. M., Houweling, A. C., Clout, D. E. W., & Moorman, A. F. M. (2000b). Patterning the embryonic heart: Identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Developmental Biology*, 224(2), 263-274. doi: 10.1006/dbio.2000.9801
- Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T. M., Trowe, M. O., Prall, O. W. J., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R.P., Moorman, A.F.M., Kispert, A. (2006). Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. [Article]. *Circulation Research*, 98(12), 1555-1563. doi: 10.1161/01.res.0000227571.84189.65
- Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. M. (2009). Development of the Cardiac Conduction System. Why Are Some Regions of the Heart More Arrhythmogenic Than Others? *Circulation-Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(2), 195-207. doi: 10.1161/circep.108.829341
- Christoffels, V. M., Smits, G. J., Kispert, A., & Moorman, A. F. M. (2010). Development of the Pacemaker Tissues of the Heart. [Review]. *Circulation Research*, 106(2), 240-254. doi: 10.1161/circresaha.109.205419
- Chuck, E. T., Freeman, D. M., Watanabe, M., & Rosenbaum, D. S. (1997). Changing activation sequence in the embryonic chick heart - Implications for the development of the His-Purkinje system. [Article; Proceedings Paper]. *Circulation Research*, 81(4), 470-476.
- Ciruna, B., & Rossant, J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. [Article]. *Developmental Cell*, 1(1), 37-49.
- Clement, C. A., Kristensen, S. G., Mollgard, K., Pazour, G. J., Yoder, B. K., Larsen, L. A., & Christensen, S. T. (2009). The primary cilium coordinates early cardiogenesis and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation. [Article]. *Journal of Cell Science*, 122(17), 3070-3082. doi: 10.1242/jcs.049676
- Cohen, E. D., Miller, M. F., Wang, Z. C., Moon, R. T., & Morrisey, E. E. (2012). Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. *Development*, 139(11), 1931-1940. doi: 10.1242/dev.069377
- CohenGould, L., & Mikawa, T. (1996). The fate diversity of mesodermal cells within the heart field during chicken early embryogenesis. [Article]. *Developmental Biology*, 177(1), 265-273.
- Colas, J. F., Lawson, A., & Schoenwolf, G. C. (2000). Evidence that translation of smooth muscle alpha-actin mRNA is delayed in the chick promyocardium until fusion of the

- bilateral heart-forming regions. [Article]. *Developmental Dynamics*, 218(2), 316-330.
- Collins, C., Guilluy, C., Welch, C., O'Brien, E. T., Hahn, K., Superfine, R., BurrIDGE, K., Tzima, E. (2012). Localized Tensional Forces on PECAM-1 Elicit a Global Mechanotransduction Response via the Integrin-RhoA Pathway. *Current Biology*, 22(22), 2087-2094. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.051
- Combs, M. D., & Yutzey, K. E. (2009). VEGF and RANKL Regulation of NFATc1 in Heart Valve Development. [Article]. *Circulation Research*, 105(6), 565-574. doi: 10.1161/circresaha.109.196469
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D., & Carmeliet, P. (2003). Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 alpha. [Article]. *Cardiovascular Research*, 60(3), 569-579. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.07.003
- Compton, L. A., Potash, D. A., Brown, C. B., & Barnett, J. V. (2007). Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circulation Research*, 101(8), 784-791. doi: 10.1161/circresaha.107.152082
- Compton, L. A., Potash, D. A., Mundell, N. A., & Barnett, J. V. (2006). Transforming growth factor-beta induces loss of epithelial character and smooth muscle cell differentiation in epicardial cells. *Developmental Dynamics*, 235(1), 82-93. doi: 10.1002/dvdy.20629
- Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B., & Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for Nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. [Article]. *Development*, 120(7), 1919-1928.
- Contreras-Ramos, A., Sanchez-Gomez, C., Fierro-Pastrana, R., Gonzalez-Marquez, H., Acosta-Vazquez, F., & Arellano-Galindo, J. (2009). Normal Development of the Muscular Region of the Interventricular Septum. II. The Importance of Myocardial Proliferation. [Article]. *Anatomia Histologia Embryologia*, 38(3), 219-228. doi: 10.1111/j.1439-0264.2008.00926.x
- Contreras-Ramos, A., Sanchez-Gomez, C., Garcia-Romero, H. L., & Cimarosti, L. O. (2008). Normal development of the muscular region of the interventricular septum - I. The significance of the ventricular trabeculations. [Article]. *Anatomia Histologia Embryologia*, 37(5), 344-351. doi: 10.1111/j.1439-0264.2008.00852.x
- Cossette, S., & Misra, R. (2011). The Identification of Different Endothelial Cell Populations Within the Mouse Proepicardium. [Article]. *Developmental Dynamics*, 240(10), 2344-2353. doi: 10.1002/dvdy.22724
- Costantini, D. L., Arruda, E. P., Agarwal, P., Kim, K. H., Zhu, Y. H., Zhu, W., Lebel, M., Cheng, C.W., Park, C.Y., Pierce, S.A., Guerchikoff, A., Pollevick, G.D., Chan T.Y., Kabir, M.G., Cheng, S.H., Husain, M., Antzelevitch, C., Srivastava, D., Gross, G.J., Hui, C.C., Backx, P.H., Bruneau, B. G. (2005). The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. [Article]. *Cell*, 123(2), 347-358. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.004
- Costello, I., Pimeisl, I. M., Drager, S., Bikoff, E. K., Robertson, E. J., & Arnold, S. J. (2011). The T-box transcription factor *Eomesodermin* acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1084-1108. doi: 10.1038/ncb2304
- Cottrill, C.M., Rosedale, P.D. (1992). A comparison of congenital heart disease in horses and man. *Equine Veterinary Journal*, 24(5), 338-340
- Creemers, E. E., Sutherland, L. B., McAnally, J., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2006). Myocardin is a direct transcriptional target of *Mef2*, *Tead* and *Foxo* proteins during cardiovascular development. *Development*, 133(21), 4245-4256. doi: 10.1242/dev.02610
- Cribbs, L. L., Martin, B. L., Schroder, E. A., Keller, B. B., Delisle, B. P., & Satin, J. (2001). Identification of the T-type calcium channel (Ca(V)3.1d) in developing mouse heart.

- Circulation Research*, 88(4), 403-407.
- Crossley, P. H., & Martin, G. R. (1995). The Mouse Fgf8 Gene Encodes a Family of Polypeptides and Is Expressed in Regions That Direct Outgrowth and Patterning in the Developing Embryo. [Article]. *Development*, 121(2), 439-451.
- Cui, C., Chevront, T. J., Lansford, R. D., Moreno-Rodriguez, R. A., Schultheiss, T. M., & Rongish, B. J. (2009a). Dynamic positional fate map of the primary heart-forming region. [Article]. *Developmental Biology*, 332(2), 212-222. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.570
- Cui, C., Little, C. D., & Rongish, B. J. (2009b). Rotation of Organizer Tissue Contributes to Left-Right Asymmetry. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(4), 557-561. doi: 10.1002/ar.20872
- Dame, C., Kirschner, K. M., Bartz, K. V., Wallach, T., Hussels, C. S., & Scholz, H. (2006). Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood*, 107(11), 4282-4290. doi: 10.1182/blood-2005-07-2889
- Darwich, R., Li, W. J., Yamak, A., Komati, H., Andelfinger, G., Sun, K., & Nemer, M. (2017). KLF13 is a genetic modifier of the Holt-Oram syndrome gene TBX5. *Human Molecular Genetics*, 26(5), 942-954. doi: 10.1093/hmg/ddx009
- Dathe, V., Gamel, A., Manner, J., Brand-Saberi, B., & Christ, B. (2002). Morphological left-right asymmetry of Hensen's node precedes the asymmetric expression of Shh and Fgf8 in the chick embryo. [Article]. *Anatomy and Embryology*, 205(5-6), 343-354. doi: 10.1007/s00429-002-0269-2
- David, R., Brenner, C., Stieber, J., Schwarz, F., Brunner, S., Vollmer, M., Mentele, E., Muller-Hocker, J., Kitajima, S., Lickert, H., Rupp, R., Franz, W. M. (2008). MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. [Article]. *Nature Cell Biology*, 10(3), 338-U375. doi: 10.1038/ncb1696
- Davidson, B. (2007). *Ciona intestinalis* as a model for cardiac development. [Review]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(1), 16-26. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.12.007
- Davies, F., & Francis, E. T. (1946). The conducting system of the vertebrate heart. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 21(4), 173-188.
- Davis, C.L. (1927). Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Contributions to Embryology*, 19, 245-284
- Davis, D. L., Edwards, A. V., Juraszek, A. L., Phelps, A., Wessels, A., & Burch, J. B. E. (2001). A GATA-6 gene heart-region-specific enhancer provides a novel means to mark and probe a discrete component of the mouse cardiac conduction system. [Article]. *Mechanisms of Development*, 108(1-2), 105-119. doi: 10.1016/s0925-4773(01)00500-7
- Davis, L. M., Kanter, H. L., Beyer, E. C., & Saffitz, J. E. (1994). Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. *Journal of the American College of Cardiology*, 24(4), 1124-1132.
- De Almeida, I., Oliveira, N. M. M., Randall, R. A., Hill, C. S., McCoy, J. M., & Stern, C. D. (2017). Calreticulin is a secreted BMP antagonist, expressed in Hensen's node during neural induction. *Developmental Biology*, 421(2), 161-170. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.12.001
- De Haan, R. L. (1965). Morphogenesis of the heart. In: R.L. DeHaan und H. Ursprung (eds): *Organogenesis*. Verlag Holt, Rinehart and Winston, New York, S. 377-419
- De Jong, F., Ophhof, T., Wilde, A. A. M., Janse, M. J., Charles, R., Lamers, W. H., and Moorman, A. F. M. (1992). Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. *Circulation Research*, 71(2), 240-250.
- De La Cruz, M.V. und Sanchez.-Gomez. C. (1998). Straight tube heart.Primitive cardiac cavities vs. primitive cardiac segments. In: de La Cruz M.V., Markwald, R.R. (eds):

- Living morphogenesis of the heart*. Cardiovascular molecular morphogenesis. Birkhäuser Verlag, Boston, MA, S. 85-98
- de la Pompa, J. L., Timmerman, L. A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A. J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B.L., Crabtree, G.R., Mak, T. W. (1998). Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature*, 392(6672), 182-186.
- de la Rosa, A. J., Dominguez, J. N., Sedmera, D., Sankova, B., Hove-Madsen, L., Franco, D., & Aranega, A. E. (2013). Functional suppression of Kcnq1 leads to early sodium channel remodelling and cardiac conduction system dysmorphogenesis. *Cardiovascular Research*, 98(3), 504-514. doi: 10.1093/cvr/cvt076
- de Lange, F. J., Moorman, A. F. M., Anderson, R. H., Manner, J., Soufan, A. T., de Vries, C. D., Schneider, M.D., Webb, S., van den Hoff, M.J.B, Christoffels, V. M. (2004). Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. [Article]. *Circulation Research*, 95(6), 645-654. doi: 10.1161/01.RES.0000141429.13560.cb
- de Vlaming, A., Sauls, K., Hajdu, Z., Visconti, R. P., Mehesz, A. N., Levine, R. A., Slauchaupt, S.A., Hagege, A., Chester, A.H., Markwald, R.R., Norris, R. A. (2012). Atrioventricular valve development: New perspectives on an old theme. [Article]. *Differentiation*, 84(1), 103-116 doi: 10.1016/j.diff.2012.04.001
- Deacon, D. C., Nevis, K. R., Cashman, T. J., Zhou, Y., Zhao, L., Washko, D., Guner-Ataman, B., Burns, C.G., Burns, C. E. (2010). The miR-143-adducin3 pathway is essential for cardiac chamber morphogenesis. [Article]. *Development*, 137(11), 1887-1896. doi: 10.1242/dev.050526
- Degenhardt, K., Singh, M. K., Aghajanian, H., Massera, D., Wang, Q. H., Li, J., Li, L., Choi, C., Yzaguirre, A.D., Francey, L.J., Gallant, E., Krantz, I.D., Gruber, P.J., Epstein, J. A. (2013). Semaphorin 3d signaling defects are associated with anomalous pulmonary venous connections. *Nature Medicine*, 19(6), 760-765. doi: 10.1038/nm.3185
- DeGross, C. G., Thornburg, B. L., Pentecost, J. O., Thornburg, K. L., Gharib, M., Sahn, D. J., & Baptista, A. (2003). Flow in the early embryonic human heart: A Numerical Study. *Pediatric Cardiology*, 24(4), 375-380. doi: 10.1007/s00246-002-0343-9
- Dehaan, R. L. (1959). Cardia bifida and the development of pacemaker function in the early chick heart. [Article]. *Developmental Biology*, 1(6), 586-602.
- Dehaan, R. L. (1961). Differentiation of the atrioventricular conducting system of the heart. *Circulation*, 24(2), 458-470.
- Dehaan, R. L. (1964). Cell interactions and oriented movements during development. *The Journal of experimental zoology*, 157, 127-138.
- Dejong, F., Geerts, W. J. C., Lamers, W. H., Los, J. A., & Moorman, A. F. M. (1990). Isomyosin Expression Pattern During Formation of the Tubular Chicken Heart - a 3-Dimensional Immunohistochemical Analysis. [Article]. *Anatomical Record*, 226(2), 213-227.
- deJong, F., Viragh, S., & Moorman, A. F. M. (1997). Cardiac development: A morphologically integrated molecular approach. *Cardiology in the Young*, 7(2), 131-146.
- Dekker, R. J., van Soest, S., Fontijn, R. D., Salamanca, S., de Groot, P. G., VanBavel, E., Pannekoek, H., Horrevoets, A. J. G. (2002). Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood*, 100(5), 1689-1698. doi: 10.1182/blood-2002-01-0046
- Dekker, R. J., van Thienen, J. V., Rohlena, J., de Jager, S. C., Elderkamp, Y. W., Seppen, J., de Vries, C.J.M., Biessen, E.A.L., van Berkel, T.J.C., Pannekoek, H., Horrevoets, A. J. G. (2005). Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *American Journal of Pathology*, 167(2), 609-618. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63002-7
- del Monte, G., Casanova, J. C., Guadix, J. A., MacGrogan, D., Burch, J. B. E., Perez-

- Pomares, J. M., & de la Pompa, J. L. (2011). Differential Notch Signaling in the Epicardium Is Required for Cardiac Inflow Development and Coronary Vessel Morphogenesis. *Circulation Research*, *108*(7), 824-836. doi: 10.1161/circresaha.110.229062
- delaCruz, M. V., Castillo, M. M., Villavicencio, L., Valencia, A., & MorenoRodriguez, R. A. (1997). Primitive interventricular septum, its primordium, and its contribution in the definitive interventricular septum: In vivo labelling study in the chick embryo heart. [Article]. *Anatomical Record*, *247*(4), 512-520
- Delacruz, M. V., Sanchezgomez, C., Palomino, M. A. (1989). The primitive cardiac regions in the straight tube heart (stage 9) and their anatomical expression in the mature heart – an experimental study in the chick embryo. [Article]. *Journal of Anatomy*, *165*, 121-131.
- Delorme, B., Dahl, E., JarryGuichard, T., Briand, J. P., Willecke, K., Gros, D., & TheveniauRuissy, M. (1997). Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. [Article]. *Circulation Research*, *81*(3), 423-437.
- Delorme, B., Dahl, E., Jarryguichard, T., Marics, I., Briand, J. P., Willecke, K., Gros, D., Theveniaurussy, M. (1995). Developmental regulation of Connexin40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Developmental Dynamics*, *204*(4), 358-371.
- Denyer, J. C., & Brown, H. F. (1990). Rabbit sinoatrial node cells - isolation and electrophysiological properties. *Journal of Physiology-London*, *428*, 405-424.
- Deruiter, M. C., Gittenbergerdegroot, A. C., Wenink, A. C. G., Poelmann, R. E., Mentink, M. M. T. (1995). In normal development pulmonary veins are connected to the sinus venosus segment in the left atrium. [Article]. *Anatomical Record*, *243*(1), 84-92. doi: 10.1002/ar.1092430110
- Deruiter, M. C., Poelmann, R. E., Mentink, M. M. T., Vaniperen, L., & Gittenbergerdegroot, A. C. (1993). Early formation of the vascular system in quail embryos. *Anatomical Record*, *235*(2), 261-274. doi: 10.1002/ar.1092350210
- Deruiter, M. C., Poelmann, R. E., Vanderplasdevries, I., Mentink, M. M. T., Gittenbergerdegroot, A. C. (1992). The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos - fusion of two heart tubes. [Article]. *Anatomy and Embryology*, *185*(5), 461-473.
- Dettman, R. W., Denetclaw, W., Ordahl, C. P., & Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Developmental Biology*, *193*(2), 169-181. doi: 10.1006/dbio.1997.8801
- Devine, W. P., Wythe, J. D., George, M., Koshiba-Takeuchi, K., Bruneau, B. G. (2014). Early Patterning and Specification of Cardiac Progenitors in Gastrulating Mesoderm. *Elife*, *3*: e03848. doi: 10.7554/eLife.03848
- Dietrich, A. C., Lombardo, V. A., & Abdelilah-Seyfried, S. (2014). Blood Flow and Bmp Signaling Control Endocardial Chamber Morphogenesis. *Developmental Cell*, *30*(4), 367-377. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.020
- Difrancesco, D. (1981). A study of the ionic nature of the pacemaker current in calf purkinje fibres. *Journal of Physiology-London*, *314*(MAY), 377-393.
- Diman, N. Y. S. G., Brooks, G., Kruithof, B. P. T., Elemento, O., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Basson, C.T., Hatcher, C. J. (2014). Tbx5 Is Required for Avian and Mammalian Epicardial Formation and Coronary Vasculogenesis. *Circulation Research*, *115*(10), 834-844. doi: 10.1161/circresaha.115.304379
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., & Zeiher, A. M. (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *Journal of Experimental Medicine*,

- 185(4), 601-607. doi: 10.1084/jem.185.4.601
- Dobrzynski, H., Li, J., Tellez, J., Greener, I. D., Nikolski, V. P., Wright, S. E., Parson, S.H., Jones, S.A., Lancaster, M.K., Yamamoto, M., Honjo, H., Takagishi, Y., Kodama, I., Efimov, I.R., Billeter, R., Boyett, M. R. (2005). Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation*, 111(7), 846-854. doi: 10.1161/01.cir.0000152100.04087.db
- Dobrzynski, H., Nikolski, V. P., Sambelashvili, A. T., Greener, I. D., Yamamoto, M., Boyett, M. R., & Efimov, I. R. (2003). Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circulation Research*, 93(11), 1102-1110. doi: 10.1161/01.res.0000101913.95604.b9
- Dodou, E., Verzi, M. P., Anderson, J. R., Xu, S. M., & Black, B. L. (2004). Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*, 131(16), 3931-3942. doi: 10.1242/dev.01256
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L. T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., Tournier-Lasserre, E., Gridley, T., Joutel, A. (2004). Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes & Development*, 18(22), 2730-2735. doi: 10.1101/gad.308904
- Dominguez, J. N., Meilhac, S. M., Bland, Y. S., Buckingham, M. E., & Brown, N. A. (2012). Asymmetric Fate of the Posterior Part of the Second Heart Field Results in Unexpected Left/Right Contributions to Both Poles of the Heart. [Article]. *Circulation Research*, 111(10), 1323-1335. doi: 10.1161/circresaha.112.271247
- Domokos, G., & Healey, T. J. (2005). Multiple helical perversions of finite, intristically curved rods. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 15(3), 871-890. doi: 10.1142/s0218127405012430
- Dor, Y., Camenisch, T. D., Itin, A., Fishman, G. I., McDonald, J. A., Carmeliet, P., & Keshet, E. (2001). A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Development*, 128(9), 1531-1538.
- Dor, Y., Klewer, S. E., McDonald, J. A., Keshet, E., & Camenisch, T. D. (2003). VEGF modulates early heart valve formation. [Article]. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 271A(1), 202-208. doi: 10.1002/ar.a.10026
- Douglas, Y. L., Jongbloed, M. R. M., den Hartog, W. C. E., Bartelings, M. M., Bogers, A., Ebels, T., DeRuiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A. C. (2009a). Pulmonary vein and atrial wall pathology in human total anomalous pulmonary venous connection. [Article]. *International Journal of Cardiology*, 134(3), 302-312. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.11.098
- Douglas, Y. L., Jongbloed, M. R. M., DeRuiter, M. C., & Gittenberger-de Groot, A. C. (2011). Normal and abnormal development of pulmonary veins: State of the art and correlation with clinical entities. *International Journal of Cardiology*, 147(1), 13-24. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.07.004
- Douglas, Y. L., Mahtab, E. A. F., Jongbloed, M. R. M., Uhrin, P., Zaujec, J., Binder, B. R., Schalij, M.J., Poelmann, R.E., DeRuiter, M.C., Gittenberger-De Groot, A. C. (2009b). Pulmonary Vein, Dorsal Atrial Wall and Atrial Septum Abnormalities in Podoplanin Knockout Mice With Disturbed Posterior Heart Field Contribution. [Article]. *Pediatric Research*, 65(1), 27-32.
- Dräger, S. (2013). Expressionsanalyse neu identifizierter potenzieller Zielgene von Eomesodermin während der Maus-Gastrulation. Doctoral dissertation, Universität. abgerufen von <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:25-opus-91590> am 20.5.2016
- Drake, C. J., & Fleming, P. A. (2000). Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*, 95(5), 1671-1679.
- Dyer, L., Wu, Y. X., Moser, M., & Patterson, C. (2014). BMPER-induced BMP signaling

- promotes coronary artery remodeling. *Developmental Biology*, 386(2), 385-394. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.12.019
- Dyer, L. A., & Kirby, M. L. (2009). The role of secondary heart field in cardiac development. [Review]. *Developmental Biology*, 336(2), 137-144. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.009
- Eckert, R., Randall, D., and Augustine, G. (1988). *Animal physiology. Mechanisms and adaptations* (3 ed.). Verlag W.H. Freeman and co., New York, 1-683
- Egorova, A. D., Khedoe, P., Goumans, M., Yoder, B. K., Nauli, S. M., ten Dijke, P., Poelmann, R.E., Hierck, B. P. (2011a). Lack of Primary Cilia Primes Shear-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Circulation Research*, 108(9), 1093-U1142. doi: 10.1161/circresaha.110.231860
- Egorova, A. D., Van der Heiden, K., Van de Pas, S., Vennemann, P., Poelma, C., DeRuiter, M. C., Goumans, M., Gittenberger de Groot, A.C., ten Dijke, P., Poelmann, R.E., Hierck, B. P. (2011b). Tgf beta/Alk5 Signaling Is Required for Shear Stress Induced Klf2 Expression in Embryonic Endothelial Cells. [Article]. *Developmental Dynamics*, 240(7), 1670-1680. doi: 10.1002/dvdy.22660
- Eisenberg, C. A., & Eisenberg, L. M. (1999). WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. [Article]. *Developmental Dynamics*, 216(1), 45-58.
- Eisenberg, L. M., & Eisenberg, C. A. (2007). Evaluating the role of Wnt signal transduction in promoting the development of the heart. [Review]. *The Scientific World Journal*, 7, 161-176. doi: 10.1100/tsw.2007.71
- England, J., Pang, K. L., Parnall, M., Haig, M. I., & Loughna, S. (2016). Cardiac troponin T is necessary for normal development in the embryonic chick heart. *Journal of Anatomy*, 229(3), 436-449. doi: 10.1111/joa.12486
- Engleka, K. A., Gitler, A. D., Zhang, M. Z., Zhou, D. D., High, F. A., Epstein, J. A. (2005). Insertion of Cre into the Pax3 locus creates a new allele of Splotch and identifies unexpected Pax3 derivatives. [Article]. *Developmental Biology*, 280(2), 396-406. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.002
- Engleka, K. A., Manderfield, L. J., Brust, R. D., Li, L., Cohen, A., Dymecki, S. M., Epstein, J. A. (2012). Islet1 Derivatives in the Heart Are of Both Neural Crest and Second Heart Field Origin. [Article]. *Circulation Research*, 110(7), 922-U947. doi: 10.1161/circresaha.112.266510
- Epstein JA, L. J., Lang D, Chen F, Brown CB, Jin F, Lu MM, Thomas M, Liu E, Wessels A, Lo CW. (2000). Migration of cardiac neural crest cells in Splotch embryos. [review]. *Development*, 127(9), 1869-1878.
- Eralp, I., Lie-Venema, H., Bax, N. A. M., Wijffels, M., Van der Laarse, A., Deruiter, M. C., Bogers, A., Van den Akker, N.M.S., Gourdie, R.G., Schali, M.J., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A. C. (2006). Epicardium-derived cells are important for correct development of the Purkinje fibers in the avian heart. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 288A(12), 1272-1280. doi: 10.1002/ar.a.20398
- Eralp, I., Lie-Venema, H., DeRuiter, M. C., van den Akker, N. M. S., Bogers, A., Mentink, M. M. T., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A. C. (2005). Coronary artery and orifice development is associated with proper timing of epicardial outgrowth and correlated Fas ligand associated apoptosis patterns. *Circulation Research*, 96(5), 526-534. doi: 10.1161/01.RES.0000158965.34647.4e
- Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H., Moore, M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. [Article]. *Development*, 124(24), 4999-5011.
- Erokhina, I. L., & Romyantsev, P. P. (1988). Proliferation and biosynthetic activities of myocytes from conductive system and working myocardium of the developing mouse heart - light microscopic autoradiographic study. *Acta Histochemica*, 84(1), 51-66.

- Espinoza-Lewis, R. A., Liu, H. B., Sun, C., Chen, C. H., Jiao, K., & Chen, Y. P. (2011). Ectopic expression of Nkx2.5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. *Developmental Biology*, 356(2), 359-369. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.663
- Espinoza-Lewis, R. A., Yu, L., He, F. L., Liu, H. B., Tang, R. H., Shi, J. L., Sun, X.X., Martin, J.F., Wang, D.Z., Yang, J., Chen, Y. P. (2009). Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. [Article]. *Developmental Biology*, 327(2), 376-385. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.12.028
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. [Review]. *Nature*, 420(6916), 629-635. doi: 10.1038/nature01148
- Eyal-Giladi, H., & Kochav, S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. *Developmental Biology*, 49(2), 321-337. doi: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90178-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90178-0)
- Faiella, W., & Atoui, R. (2016). Therapeutic use of stem cells for cardiovascular disease. *Clinical and Translational Medicine*, 5: 34. doi: 10.1186/s40169-016-0116-3
- Farmer, C. G. (1999). Evolution of the vertebrate cardio-pulmonary system. [Review]. *Annual Review of Physiology*, 61, 573-592.
- Faustino, R. S., Behfar, A., Groenendyk, J., Wyles, S. P., Niederlander, N., Reyes, S., Puceat, M., Michalak, M., Terzic, A., Perez-Terzic, C. (2016). Calreticulin secures calcium-dependent nuclear pore competency required for cardiogenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 92, 63-74. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.022
- Feiner, L., Webber, A. L., Brown, C. B., Lu, M. M., Jia, L., Feinstein, P., Mombaerts, P., Epstein, J.A., Raper, J. A. (2001). Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption. *Development*, 128(16), 3061-3070.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., Dechiara, T. M., & Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF4 for postimplantation mouse development. *Science*, 267(5195), 246-249. doi: 10.1126/science.7809630
- Feng, Y., Yu, Y. M., Yin, M. Z., Hong, L., & Cai, W. (2012). Ectopic Expression of Retinoic Acid Receptors and Change of Myocardial Structure in the Offspring Heart with Vitamin A Deficiency. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 58(5), 309-318.
- Ferdous, A., Caprioli, A., Iacovino, M., Martin, C. M., Morris, J., Richardson, J. A., Latif, S., Hammer, R.E., Harvey, R.P., Olson, E.N., Kyba, M., Garry, D. J. (2009). Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 814-819. doi: 10.1073/pnas.0807583106
- Field, E. J. (1946). The early development of the sheep heart. *Journal of Anatomy*, 80(2), 75-87.
- Firulli, A. B., McFadden, D. G., Lin, Q., Srivastava, D., & Olson, E. N. (1998). Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. [Article]. *Nature Genetics*, 18(3), 266-270.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., & Gessler, M. (2004). The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes & Development*, 18(8), 901-911. doi: 10.1101/gad.291004
- Fischer, A., Viebahn, C., & Blum, M. (2002). FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit. [Article]. *Current Biology*, 12(21), 1807-1816.
- Fischer, J. (2008). Regulatorische Netzwerke der Genexpression in Herz- und Skelettmuskelzellen auf der Ebene von Histonmodifikationen und Transkriptionsfaktoren. Doctoral dissertation. Universität. Available from Dokumentenserver der Universitätsbibliothek Retrieved 14. 01. 2008, from FB

- Biologie, Chemie, Pharmazie FU Berlin [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receiveFUDISS\\_thesis\\_000000003521](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receiveFUDISS_thesis_000000003521)
- Fishman, M. C., & Chien, K. R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: Earliest embryonic decisions. *Development*, *124*(11), 2099-2117.
- Ford, S. M., McPheeters, M. T., Wang, Y. T., Ma, P., Gu, S., Strainic, J., Snyder, C., Rollins, A.M., Watanabe, M., Jenkins, M. W. (2017). Increased regurgitant flow causes endocardial cushion defects in an avian embryonic model of congenital heart disease. *Congenital Heart Disease*, *12*(3), 322-331. doi: 10.1111/chd.12443
- Foxon, G. E. H. (1955). Problems of the double circulation in vertebrates. [Article]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *30*(2), 196-228.
- Franco, D., Campione, M., Kelly, R., Zammit, P. S., Buckingham, M., Lamers, W. H., & Moorman, A. F. M. (2000). Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart. [Article]. *Circulation Research*, *87*(11), 984-991.
- Franco, D., Meilhac, S. M., Christoffels, V. M., Kispert, A., Buckingham, M., & Kelly, R. G. (2006). Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart. *Developmental Biology*, *294*(2), 366-375. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.045
- Francou, A., De Bono, C., & Kelly, R. G. (2017). Epithelial tension in the second heart field promotes mouse heart tube elongation. *Nature Communications*, *8*: 14770. doi: 10.1038/ncomms14770
- Fredriksson, L., Li, H., & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *15*(4), 197-204. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.007
- Fromaget, C., Elaoumari, A., & Gros, D. (1992). Distribution pattern of Connexin43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*, *51*(1), 9-20. doi: 10.1111/j.1432-0436.1992.tb00675.x
- Fu, Y. C., Yan, W., Mohun, T. J., & Evans, S. M. (1998). Vertebrate tinman homologues XNkx2-3 and XNkx2-5 are required for heart formation in a functionally redundant manner. [Article]. *Development*, *125*(22), 4439-4449.
- Fujiwara, T., Dehart, D. B., Sulik, K. K., & Hogan, B. L. M. (2002). Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse. [Article]. *Development*, *129*(20), 4685-4696.
- Galli, D., Dominguez, J. N., Zaffran, S., Munk, A., Brown, N. A., & Buckingham, M. E. (2008). Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed. [Article]. *Development*, *135*(6), 1157-1167. doi: 10.1242/dev.014563
- Gao, Z. G., Kim, G. H., Mackinnon, A. C., Flagg, A. E., Bassett, B., Earley, J. U., & Svensson, E. C. (2010). Ets1 is required for proper migration and differentiation of the cardiac neural crest. [Article]. *Development*, *137*(9), 1543-1551. doi: 10.1242/dev.047696
- Garcia-Castro, M. I., Vielmetter, E., & Bronner-Fraser, M. (2000). N-cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry. [Article]. *Science*, *288*(5468), 1047-1051.
- Garciamartinez, V., & Schoenwolf, G. C. (1993). Primitive-Streak Origin of the Cardiovascular-System in Avian Embryos. [Article]. *Developmental Biology*, *159*(2), 706-719.
- Garg, V., Kathiriya, I. S., Barnes, R., Schluterman, M. K., King, I. N., Butler, C. A., Rothrock, C.R., Eapen, R.S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J. C. (2003). GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. [Meeting Abstract]. *Circulation*, *108*(17), 141-142.

- Garg, V., Muth, A. N., Ransom, J. F., Schluterman, M. K., Barnes, R., King, I. N., Grossfeld, P.D., Srivastava, D. (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. [Article]. *Nature*, 437(7056), 270-274. doi: 10.1038/nature03940
- Garg, V., Yamagishi, C., Hu, T. H., Kathiriyai, I. S., Yamagishi, H., & Srivastava, D. (2001). Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by Sonic hedgehog during pharyngeal arch development. [Article]. *Developmental Biology*, 235(1), 62-73. doi: 10.1006/dbio.2001.0283
- Garita, B., Jenkins, M. W., Han, M. D., Zhou, C., VanAuker, M., Rollins, A. M., Watanabe, M., Fujimoto, J.G., Linask, K. K. (2011). Blood flow dynamics of one cardiac cycle and relationship to mechanotransduction and trabeculation during heart looping. [Article]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(3), H879-H891. doi: 10.1152/ajpheart.00433.2010
- Gassanov, N., Er, F., Zagidullin, N., & Hoppe, U. C. (2004). Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *Faseb Journal*, 18(12), 1710-1712. doi: 10.1096/fj.04-1619fje
- Gaussin, V., Morley, G. E., Cox, L., Zwijsen, A., Vance, K. M., Emile, L., Tian, Y.M., Liu, J., Hong, C., Myers, D., Conway, S.J., Depre, C., Mishina, Y., Behringer, R.R., Hanks, M.C., Schneider, M.D., Huylebroeck, D., Fishman, G.I., Burch, J.B.E., Vatner, S. F. (2005). Alk3/Bmpr1a receptor is required for development of the atrioventricular canal into valves and annulus fibrosus. *Circulation Research*, 97(3), 219-226. doi: 10.1161/01.res.0000177862.85474.63
- Gavrilov, S., & Lacy, E. (2013). Genetic dissection of ventral folding morphogenesis in mouse: embryonic visceral endoderm-supplied BMP2 positions head and heart. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(4), 461-469. doi: 10.1016/j.gde.2013.04.001
- Gerhardt, C., Lier, J. M., Kuschel, S., & Ruther, U. (2013). The Ciliary Protein Ftm Is Required for Ventricular Wall and Septal Development. *PLoS One*, 8(2): e57545. doi: 10.1371/journal.pone.0057545
- Gertow, K., Hirst, C. E., Yu, Q. C., Ng, E. S., Pereira, L. A., Davis, R. P., Stanley, E.G., Elefanty, A. G. (2013). WNT3A Promotes Hematopoietic or Mesenchymal Differentiation from hESCs Depending on the Time of Exposure. *Stem Cell Reports*, 1(1), 53-65. doi: https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.04.002
- Gitler, A. D., Brown, C. B., Kochilas, L., Li, J., & Epstein, J. A. (2002). Neural crest migration and mouse models of congenital heart disease. [Article; Proceedings Paper]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 67, 57-62. doi: 10.1101/sqb.2002.67.57
- Gitler, A. D., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2004). PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Developmental Cell*, 7(1), 107-116. doi: 10.1016/j.devcel.2004.06.002
- Gittenberger-de Groot, A. C., Calkoen, E. E., Poelmann, R. E., Bartelings, M. M., & Jongbloed, M. R. M. (2014). Morphogenesis and molecular considerations on congenital cardiac septal defects. *Annals of Medicine*, 46(8), 640-652. doi: 10.3109/07853890.2014.959557
- Gittenberger-de Groot, A. C., Peeters, M., Bergwerff, M., Mentink, M. M. T., & Poelmann, R. E. (2000). Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circulation Research*, 87(11), 969-971.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Peeters, M., Mentink, M. M. T., Gourdie, R. G., & Poelmann, R. E. (1998). Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circulation Research*, 82(10), 1043-1052.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Winter, E. M., Bartelings, M. M., Goumans, M. J., DeReuter, M. C., & Poelmann, R. E. (2012). The arterial and cardiac epicardium in development,

- disease and repair. *Differentiation*, 84(1), 41-53. doi: 10.1016/j.diff.2012.05.002
- Goddeeris, M. M., Rho, S., Petiet, A., Davenport, C. L., Johnson, G. A., Meyers, E. N., & Klingensmith, J. (2008). Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart. [Article]. *Development*, 135(10), 1887-1895. doi: 10.1242/dev.016147
- Goenezen, S., Rennie, M. Y., & Rugonyi, S. (2012). Biomechanics of early cardiac development. [Article]. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(8), 1187-1204. doi: 10.1007/s10237-012-0414-7
- Gonzalez-Iriarte, M., Carmona, R., Perez-Pomares, J. M., Macias, D., Costell, M., & Munoz-Chapuli, R. (2003). Development of the coronary arteries in a murine model of transposition of great arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(7), 795-802. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00134-2
- Goor, D. A., Edwards, J. E., & Lillehei, C. W. (1970). Development of the interventricular septum of the human heart – correlative morphogenetic study. *Chest*, 58(5), 453-&. doi: 10.1378/chest.58.5.453
- Gorza, L., Schiaffino, S., & Volpe, P. (1993). Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in the heart - evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system. *Journal of Cell Biology*, 121(2), 345-353. doi: 10.1083/jcb.121.2.345
- Gorza, L., & Vitadello, M. (1989). Distribution of conduction system fibers in the developing and adult rabbit heart revealed by an antineurofilament antibody. *Circulation Research*, 65(2), 360-369.
- Gourdie, R. G., Harris, B. S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K. W., O'Brien, T. X., Thompson, R.P., Sedmera, D. (2003). Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Research Part C Embryo Today*, 69(1), 46-57.
- Gourdie, R. G., Mima, T., Thompson, R. P., & Mikawa, T. (1995). Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinjefibers of the cardiac conduction system . *Development*, 121(5), 1423-1431.
- Gourdie, R. G., Wei, Y., Kim, D., Klatt, S. C., & Mikawa, T. (1998). Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6815-6818. doi: 10.1073/pnas.95.12.6815
- Granados-Riveron, J. T., & Brook, J. D. (2012). The Impact of Mechanical Forces in Heart Morphogenesis. [Article]. *Circulation-Cardiovascular Genetics*, 5(1), 132-142. doi: 10.1161/circgenetics.111.961086
- Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolos, V., Melgar, P., Arandilla, A., Garratt, A.N., Zang, H., Mukoyama, Y.S., Chen, H.Y., Shou, W.N., Ballestar, E., Esteller, M., Rojas, A., Perez-Pomares, J.M., de la Pompa, J. L. (2007). Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Developmental Cell*, 12(3), 415-429. doi: 10.1016/j.devcel.2006.12.011
- Grieskamp, T., Rudat, C., Ludtke, T. H. W., Norden, J., & Kispert, A. (2011). Notch Signaling Regulates Smooth Muscle Differentiation of Epicardium-Derived Cells. *Circulation Research*, 108(7), 813-823. doi: 10.1161/circresaha.110.228809
- Grimes, M. R., Greenstein, J. S., & Foley, R. C. (1958). Observations on the early development of the haert in bovine embryos with 6 to 20 paired somites. *American Journal of Veterinary Research*, 19(72), 591-599.
- Groenendijk, B. C. W., Hierck, B. P., Gittenberger-de Groot, A. C., & Poelmann, R. E. (2004). Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular system of chicken embryos. *Developmental Dynamics*, 230(1), 57-68. doi: 10.1002/dvdy.20029
- Groenendijk, B. C. W., Van der Heiden, K., Hierck, B. P., & Poelmann, R. E. (2007). The role of shear stress on ET-1, KLF2, and NOS-3 expression in the developing cardiovascular system of chicken embryos in a venous Ligation model. *Physiology*,

- 22(6), 380-389. doi: 10.1152/physiol.00023.2007
- Groot, A., Mahtab, E. A. F., Hahurij, N. D., Wisse, L. J., Deruiter, M. C., Wijffels, M., & Poelmann, R. E. (2007). Nkx2.5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(1), 115-122.
- Gros, D., Jarryguichard, T., Tenvelde, I., Demaziere, A., Vankempen, M. J. A., Davoust, J., . . . Jongsma, H. J. (1994). Restricted distribution of Connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart. *Circulation Research*, 74(5), 839-851.
- Gros, D., Theveniau-Ruissy, M., Bernard, M., Calmels, T., Kober, F., Sohl, G., Willecke, K., Nargeot, J., Jongsma, H.J., Mangoni, M. E. (2010). Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovascular Research*, 85(1), 45-55. doi: 10.1093/cvr/cvp280
- Gros, J., Feistel, K., Viebahn, C., Blum, M., & Tabin, C. J. (2009). Cell Movements at Hensen's Node Establish Left/Right Asymmetric Gene Expression in the Chick. *Science*, 324(5929), 941-944. doi: 10.1126/science.1172478
- Guadix, J. A., Carmona, R., Munoz-Chapuli, R., & Perez-Pomares, J. M. (2006). In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. *Developmental Dynamics*, 235(4), 1014-1026. doi: 10.1002/dvdy.20685
- Guadix, J. A., Ruiz-Villalba, A., Lettice, L., Velecela, V., Munoz-Chapuli, R., Hastie, N. D., Perez-Pomares, J.M., Martinez-Estrada, O. M. (2011). Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development*, 138(6), 1093-1097. doi: 10.1242/dev.044594
- Guimaraes-Camboa, N., Stowe, J., Aneas, I., Sakabe, N., Cattaneo, P., Henderson, L., . . . Kilberg, M.S., Johnson, R.S., Chen, J., McCulloch, A.D., obrega, M.A., Evans, S.M., Zambon, A. C. (2015). HIF1 alpha Represses Cell Stress Pathways to Allow Proliferation of Hypoxic Fetal Cardiomyocytes. *Developmental Cell*, 33(5), 507-521. doi: 10.1016/j.devcel.2015.04.02
- Guimier, A., Gabriel, G. C., Bajolle, F., Tsang, M., Liu, H., Noll, A., Noll, A., Schwartz, M., El Malti, R., Smith, L. D., Klena, N. T., Jimenez, G., Miller, N. A., Oufadem, M., de Bellaing, A. M., Yagi, H., Saunders, C. J., Baker, C. N., Di Filippo, S., Peterson, K. A., Thiffault, I., Bole-Feysot, C., Cooley, L. D., Farrow, E. G., Masson, C., Schoen, P., Deleuze, J. F., Nitschke, P., Lyonnet, S., de Pontual, L., Murray, S. A., Bonnet, D., Kingsmore, S. F., Amiel, J., Bouvagnet, P., Lo, C. W Gordon, C. T. (2015). MMP21 is mutated in human heterotaxy and is required for normal left-right asymmetry in vertebrates. *Nature Genetics*, 47(11), 1260-1263. doi: 10.1038/ng.3376
- Guo, D.F., Li, R. G., Yuan, F., Shi, H. Y., Hou, X. M., Qu, X. K., Xu, Y. J., Zhang, M., Liu, X., Jiang, J. Q., Yang, Y. Q Qiu, X. B. (2016). TBX5 loss-of-function mutation contributes to atrial fibrillation and atypical Holt-Oram syndrome. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 4349-4356. doi: 10.3892/mmr.2016.5043
- Guo, J. Q., & Noma, A. (1997). Existence of a low-threshold and sustained inward current in rabbit atrio-ventricular node cells. *Japanese Journal of Physiology*, 47(4), 355-359. doi: 10.2170/jjphysiol.47.355
- Gurdon, J. B., Standley, H., Dyson, S., Butler, K., Langon, T., Ryan, K., Stennard, F., Shimizu, K., Zorn, A. (1999). Single cells can sense their position in a morphogen gradient. [Article]. *Development*, 126(23), 5309-5317.
- Gurjarpadhye, A., Hewett, K. W., Justus, C., Wen, X. J., Stadt, H., Kirby, M. L., Sedmera, D., Gourdie, R. G. (2007). Cardiac neural crest ablation inhibits compaction and electrical function of conduction system bundles. [Article]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(3), H1291-H1300. doi: 10.1152/ajpheart.01017.2006
- Guzmán, L. V., Mayoral, P. V., Valencia, J. P., Pine, S. S., & Gómez, C. S. (2010).

- Developmental Pattern of the Right Atrioventricular Septal Valve Leaflet and Tendinous Cords. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(1), 55-61. doi: 10.1002/ar.21023
- Haack, T., & Abdelilah-Seyfried, S. (2016). The force within: endocardial development, mechanotransduction and signalling during cardiac morphogenesis. *Development*, 143(3), 373-386. doi: 10.1242/dev.131425
- Habets, P., Moorman, A. F. M., Clout, D. E. W., van Roon, M. A., Lingbeek, M., van Lohuizen, M., Campione, M., Christoffels, V. M. (2002). Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes & Development*, 16(10), 1234-1246. doi: 10.1101/gad.222902
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., & Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*, 121(11), 3529-3537.
- Haggstrom, J., Fuentes, V.L., Wess, G. (2015). Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats. *Journal of Veterinary Cardiology*, 17, Supplement1, S.134-149
- Hagiwara, N., Irisawa, H., & Kameyama, M. (1988). Contribution of 2 types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *Journal of Physiology-London*, 395, 233-253.
- Hahurij, N. D., Calkoen, E. E., Jongbloed, M. R. M., Roest, A. A. W., Groot, A., Poelmann, R. E., de Rooter, M.C., van Munsteren, C.J., Steendijk, P., Blom, A. A. (2014). Echocardiographic Assessment of Embryonic and Fetal Mouse Heart Development: A Focus on Haemodynamics and Morphology. *Scientific World Journal* (2014): 531324 doi: 10.1155/2014/531324
- Hajdu, Z., Romeo, S. J., Fleming, P. A., Markwald, R. R., Visconti, R. P., & Drake, C. J. (2011). Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process. [Article]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(6), 955-965. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.006
- 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. *American Journal of Medical Genetics*, 101(4), 324-327. doi: 10.1002/ajmg.1250
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., & Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. [Review]. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 103-113.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. [Article]. *Journal of Morphology*, 88(1), 49-92. doi: 10.1002/jmor.1050880104
- Hara, Y., Wake, K., Inoue, K., Kuroda, N., Sato, A., Inamatsu, M., Tateno, C., Sato, T. (2016). Development of the Heart Endocardium at an Early Stage of Chick Embryos Evaluated at Light- and Electron-Microscopic Levels. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 299(8), 1080-1089. doi: 10.1002/ar.23372
- Harel, I., Maezawa, Y., Avraham, R., Rinon, A., Ma, H. Y., Cross, J. W., Leviatan, N., Hegesh, J., Roy, A., Jacob-Hirsch, J., Rechavi, G., Carvajal, J., Tole, S., Kioussi, C., Quaggin, S., Tzahor, E. (2012). Pharyngeal mesoderm regulatory network controls cardiac and head muscle morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18839-18844. doi: 10.1073/pnas.1208690109
- Harh, J. Y., & Paul, M. H. (1975). Experimental cardiac morphogenesis. 1. Development of ventricular septum in chick. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 33(FEB), 13-28.
- Harris, B. S., Edmonson, A. M., Serbezov, I., Rackley, M. S., Gourdie, R. G., O'Brien, T. X., & Rhj, V. (2003). Cardiac conduction system development is regulated by the cardiac

- transcription factor Nkx2.5. *Circulation*, 107(19), E138-E138.
- Harris, I. S., & Black, B. L. (2010). Development of the Endocardium. [Proceedings Paper]. *Pediatric Cardiology*, 31(3), 391-399. doi: 10.1007/s00246-010-9642-8
- Hartenstein, V., & Mandal, L. (2006). The blood/vascular system in a phylogenetic perspective. *Bioessays*, 28(12), 1203-1210. doi: 10.1002/bies.20497
- Hatada, Y., & Stern, C. D. (1994). A fate map of the epiblast of the early chick embryo. [Article]. *Development*, 120(10), 2879-2889.
- Hatcher, C. J., Diman, N., Kim, M. S., Pennisi, D., Song, Y., Goldstein, M. M., Mikawa, T., Basson, C. T. (2004). A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. [Article]. *Physiological Genomics*, 18(2), 129-140. doi: 10.1152/physiolgenomics.00060.2004
- Hatzistergos, K.E., Takeuchi, L. M., Saur, D., Seidler, B., Dymecki, S. M., Mai, J. J., White, I. A., Balkan, W., Kanashiro-Takeuchi, R. M., Schally, A. V., Hare, J. M. (2015). cKit(+) cardiac progenitors of neural crest origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(42), 13051-13056. doi: 10.1073/pnas.1517201112
- He, W., Jia, Y., & Takimoto, K. (2009). Interaction between transcription factors Iroquois proteins 4 and 5 controls cardiac potassium channel Kv4.2 gene transcription. [Article]. *Cardiovascular Research*, 81(1), 64-71. doi: 10.1093/cvr/cvn259
- He, Z., Grunewald, M., Dor, Y., & Keshet, E. (2016). VEGF regulates relative allocation of Isl1(+) cardiac progenitors to myocardial and endocardial lineages. *Mechanisms of Development*, 142, 40-49. doi: 10.1016/j.mod.2016.10.004
- Heckel, E., Boselli, F., Roth, S., Krudewig, A., Belting, H. G., Charvin, G., & Vermot, J. (2015). Oscillatory Flow Modulates Mechanosensitive klf2a Expression through trpv4 and trpp2 during Heart Valve Development. *Current Biology*, 25(10), 1354-1361. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.038
- Heine, U. I., Roberts, A. B., Munoz, E. F., Roche, N. S., & Sporn, M. B. (1985). Effects of retinoid deficiency on the development of the heart and vascular system of the quail embryo. [Article]. *Virchows Archiv B-Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 50(2), 135-152.
- Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14), 3047-3055.
- Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J. G., Zeiher, A. M., Scheffer, M. P., Frangakis, A. S., Yin, X. K., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R. A. Dimmeler, S. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14(3), 249-264. doi: 10.1038/ncb2441
- Herrmann, F., Bundschu, K., Kuhl, S. J., & Kuhl, M. (2011). Tbx5 Overexpression Favors a First Heart Field Lineage in Murine Embryonic Stem Cells and in *Xenopus laevis* Embryos. *Developmental Dynamics*, 240(12), 2634-2645. doi: 10.1002/dvdy.22776
- Herrmann, F., Gross, A., Zhou, D., Kestler, H. A., & Kuhl, M. (2012). A Boolean Model of the Cardiac Gene Regulatory Network Determining First and Second Heart Field Identity. *PLoS One*, 7(10): e46798. doi: 10.1371/journal.pone.0046798
- Hertig, C. M., Kubalak, S. W., Wang, Y. B., & Chien, K. R. (1999). Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37362-37369. doi: 10.1074/jbc.274.52.37362
- High, F. A., Jain, R., Stoller, J. Z., Antonucci, N. B., Lu, M. M., Loomes, K. M., Kaestner, K.H., Pear, W.S., Epstein, J. A. (2009). Murine Jagged1/Notch signaling in the second heart field orchestrates Fgf8 expression and tissue-tissue interactions during outflow

- tract development. [Article]. *Journal of Clinical Investigation*, 119(7), 1986-1996. doi: 10.1172/jci38922
- High, F. A., Zhang, M. Z., Proweller, A., Tu, L. L., Parmacek, M. S., Pear, W. S., & Epstein, J. A. (2007). An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 117(2), 353-363. doi: 10.1172/jci30070
- Hill, C. R., Sanchez, N. S., Love, J. D., Arrieta, J. A., Hong, C. C., Brown, C. B., Austin, A.F., Barnett, J. V. (2012). BMP2 signals loss of epithelial character in epicardial cells but requires the Type III TGF beta receptor to promote invasion. [Article]. *Cellular Signalling*, 24(5), 1012-1022. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.022
- Hinton, R. B., Adelman-Brown, J., Witt, S., Krishnamurthy, V. K., Osinska, H., Sakthivel, B., James, J. F., Li, D. Y., Narmoneva, D. A., Mecham, R. P, Benson, D. W. (2010). Elastin haploinsufficiency results in progressive aortic valve malformation and latent valve disease in a mouse model. [Article]. *Circulation Research*, 107(4), 549-557. doi: 10.1161/circresaha.110.221358
- Hinton, R. B., Lincoln, J., Deutsch, G. H., Osinska, H., Manning, P. B., Benson, D. W., & Yutzey, K. E. (2006). Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. [Article]. *Circulation Research*, 98(11), 1431-1438. doi: 10.1161/01.RES.0000224114.65109.4e
- Hirakow, R. (1983). Development of the cardiac blood vessels in staged human embryos. *Acta Anatomica*, 115(3), 220-230.
- Hiramatsu, R., Matsuoka, T., Kimura-Yoshida, C., Han, S.-W., Mochida, K., Adachi, T., Takayama, S., Matsuo, I. (2013). External Mechanical Cues Trigger the Establishment of the Anterior-Posterior Axis in Early Mouse Embryos. *Developmental Cell*, 27(2), 131-144. doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.026>
- Hiroi, Y., Kudoh, S., Monzen, K., Ikeda, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., & Komuro, I. (2001). Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. [Letter]. *Nature Genetics*, 28(3), 276-280.
- Hirose, T., Karasawa, M., Sugitani, Y., Fujisawa, M., Akimoto, K., Ohnos, S., & Noda, T. (2006). PAR3 is essential for cyst-mediated epicardial development by establishing apical cortical domains. *Development*, 133(7), 1389-1398. doi: 10.1242/dev.02294
- Hirschy, A., Schatzmann, F., Ehler, E., & Perriard, J. C. (2006). Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. [Article]. *Developmental Biology*, 289(2), 430-441. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.10.046
- Hiruma, T., & Hirakow, R. (1995). Formation of the pharyngeal arch arteries in the chick embryo - observation of corrosion casts by scanning electron microscopy. [Article]. *Anatomy and Embryology*, 191(5), 415-423. doi: 10.1007/bf00304427
- Hiruma, T., Nakajima, Y., & Nakamura, H. (2002). Development of pharyngeal arch arteries in early mouse embryo. [Article]. *Journal of Anatomy*, 201(1), 15-29. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00071.x
- His, W. (1880). *Das Herz*. In: Anatomie menschlicher Embryonen. Part III. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig. S.129-184
- Hochgreb, T., Linhares, V. L., Menezes, D. C., Sampaio, A. C., Yan, C. Y. I., Cardoso, W. V., Rosenthal, N., Xavier-Neto, J. (2003). A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. [Article]. *Development*, 130(22), 5363-5374. doi: 10.1242/dev.00750
- Hoffmann, A. D., Peterson, M. A., Friedland-Little, J. M., Anderson, S. A., & Moskowitz, I. P. (2009). sonic hedgehog is required in pulmonary endoderm for atrial septation. [Article]. *Development*, 136(10), 1761-1770. doi: 10.1242/dev.034157
- Hoffmann, A. D., Yang, X. H., Burnicka-Turek, O., Bosman, J. D., Ren, X., Steimle, J. D., Vokes, S. A., McMahon, A. P., Kalinichenko, V. V., Moskowitz, I. P. (2014). Foxf Genes Integrate Tbx5 and Hedgehog Pathways in the Second Heart Field for Cardiac

- Septation. *Plos Genetics*, 10(10), e1004604. doi: 10.1371/journal.pgen.1004604
- Hoffmann, A. D., Yang, X. H., Burnicka-Turek, O., Bosman, J. D., Ren, X., Xie, L., Steimle, J. D., Vokes, S. A., McMahan, A. P., Kalinichenko, V. V., Moskowitz, I. P. (2016). Correction: Foxf Genes Integrate Tbx5 and Hedgehog Pathways in the Second Heart Field for Cardiac Septation. *Plos Genetics*, 12(12), e1006533-e1006533. doi: 10.1371/journal.pgen.1006533
- Hoffmann, S., Berger, I. M., Glaser, A., Bacon, C., Li, L., Gretz, N., Steinbeisser, H., Rottbauer, W., Just, S., Rappold, G. (2013). Islet1 is a direct transcriptional target of the homeodomain transcription factor Shox2 and rescues the Shox2-mediated bradycardia. *Basic Research in Cardiology*, 108(2): 339. doi: 10.1007/s00395-013-0339-z
- Hofmann, J. J., Briot, A., Enciso, J., Zovein, A. C., Ren, S. X., Zhang, Z. W., Radtke, F., Simons, M., Wang, Y.B., Iruela-Arispe, M. L. (2012). Endothelial deletion of murine Jag1 leads to valve calcification and congenital heart defects associated with Alagille syndrome. *Development*, 139(23), 4449-4460. doi: 10.1242/dev.084871
- Hogers, B., Deruiter, M. C., Baasten, A. M. J., Gittenbergerdegroot, A. C., & Poelmann, R. E. (1995). Intracardiac blood-flow patterns related to the yolk-sac circulation of the chick embryo. [Article]. *Circulation Research*, 76(5), 871-877.
- Hogers, B., DeRuiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A. C., & Poelmann, R. E. (1999). Extraembryonic venous obstructions lead to cardiovascular malformations and can be embryolethal. *Cardiovascular Research*, 41(1), 87-99. doi: 10.1016/s0008-6363(98)00218-1
- Hogers, B., DeRuiter, M. C., GittenbergerdeGroot, A. C., & Poelmam, R. E. (1997). Unilateral vitelline vein ligation alters intracardiac blood flow patterns and morphogenesis in the chick embryo. *Circulation Research*, 80(4), 473-481.
- Holland, N. D., Venkatesh, T. V., Holland, L. Z., Jacobs, D. K., & Bodmer, R. (2003). Amphiox2-tin, an amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: insights into evolution of the vertebrate heart. *Developmental Biology*, 255(1), 128-137. doi: [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00050-7)
- Holmes, E. B. (1975). Reconsideration of phylogeny of tetrapod heart. [Article]. *Journal of Morphology*, 147(2), 209-228.
- Hoogaars, W. M. H., Engel, A., Brons, J. F., Verkerk, A. O., de Lange, F. J., Wong, L. Y. E., Bakker, M. L., Clout, D. E., Wakker, V., Barnett, P., Ravesloot, J. H., Moorman, A. F. M., Verheijck, E. E., Christoffels, V. M. (2007). Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. [Article]. *Genes & Development*, 21(9), 1098-1112. doi: 10.1101/gad.416007
- Hoogaars, W. M. H., Tessari, A., Moorman, A. F. M., de Boer, P. A. J., Hagoort, J., Soufan, A. T., Campione, M., Christoffels, V. M. (2004). The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovascular Research*, 62(3), 489-499. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.030
- Hosono, S., Gross, I., English, M. A., Hajra, K. M., Fearon, E. R., & Licht, J. D. (2000). E-cadherin is a WT1 target gene. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10943-10953. doi: 10.1074/jbc.275.15.10943
- Houweling, A. C., Somi, S., Van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2002). Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken. *Anatomical Record*, 266(2), 93-102. doi: 10.1002/ar.10042
- Hu, N., Christensen, D. A., Agrawal, A. K., Beaumont, C., Clark, E. B., & Hawkins, J. A. (2009). Dependence of Aortic Arch Morphogenesis on Intracardiac Blood Flow in the Left Atrial Ligated Chick Embryo. [Article]. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(5), 652-660. doi: 10.1002/ar.20885

- Hu, N., & Clark, E. B. (1989). Hemodynamics of the stage-12 to stage-29 chick embryo. *Circulation Research*, 65(6), 1665-1670.
- Hu, T. H., Yamagishi, H., Maeda, J., McAnally, J., Yamagishi, C., & Srivastava, D. (2004). Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. [Article]. *Development*, 131(21), 5491-5502.
- Hu, Y., Belyea, B. C., Li, M. H., Gothert, J. R., Gomez, A., & Sequeira-Lopez, M. L. S. (2017). Identification of cardiac hemo-vascular precursors and their requirement of sphingosine-1-phosphate receptor 1 for heart development. *Scientific Reports*, 7: 45205. doi: 10.1038/srep45205
- Hua, L. L., Vedantham, V., Barnes, R. M., Hu, J. X., Robinson, A. S., Bressan, M., Srivastava, D., Black, B. L. (2014). Specification of the mouse cardiac conduction system in the absence of Endothelin signaling. *Developmental Biology*, 393(2), 245-254. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.07.008
- Huddleson, J. P., Ahmad, N., Srinivasan, S., & Lingrel, J. B. (2005). Induction of KLF2 by fluid shear stress requires a novel promoter element activated by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent chromatin-remodeling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 23371-23379. doi: 10.1074/jbc.M413839200
- Huddleson, J. P., Srinivasan, S., Ahmad, N., & Lingrel, J. B. (2004). Fluid shear stress induces endothelial KLF2 gene expression through a defined promoter region. *Biological Chemistry*, 385(8), 723-729. doi: 10.1515/bc.2004.088
- Huhta, J., & Linask, K. K. (2013). Environmental origins of congenital heart disease: The heart-placenta connection. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 18(5), 245-250. doi: 10.1016/j.siny.2013.05.003
- Hutson, M. R., Zeng, X. L., Kim, A. J., Antoon, E., Harward, S., & Kirby, M. L. (2010). Arterial pole progenitors interpret opposing FGF/BMP signals to proliferate or differentiate. [Article]. *Development*, 137(18), 3001-3011. doi: 10.1242/dev.051565
- Hutson, M. R., Zhang, P., Stadt, H. A., Sato, A. K., Li, Y. X., Burch, J., Creazzo, T.L., Kirby, M. L. (2006). Cardiac arterial pole alignment is sensitive to FGF8 signaling in the pharynx. *Developmental Biology*, 295(2), 486-497. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.052
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M., Betteridge, K., & Overström, E. W. (2010). *Essentials of domestic animal embryology*. Verlag Saunders/Elsevier, Edinburgh.
- Idkowiak, J., Weisheit, G., Plitzner, J., & Viebahn, C. (2004). Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. [journal article]. *Development Genes and Evolution*, 214(12), 591-605. doi: 10.1007/s00427-004-0436-y
- Ieda, M., Tsuchihashi, T., Ivey, K. N., Ross, R. S., Hong, T.-T., Shaw, R. M., & Srivastava, D. (2009). Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Developmental Cell*, 16(2), 233-244. doi: 10.1016/j.devcel.2008.12.007
- Ikeya, M., Lee, S. M. K., Johnson, J. E., McMahan, A. P., & Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*, 389(6654), 966-970.
- Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y. P., Jiao, K., Schwartz, R. J., Klingensmith, J., Meyers, E. N. (2006). Fgf8 is required for anterior heart field development. [Article]. *Development*, 133(12), 2435-2445. doi: 10.1242/dev.02408
- Imanaka-Yoshida, K., Matsumoto, K., Hara, M., Sakakura, T., & Yoshida, T. (2003). The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. [Article]. *Differentiation*, 71(4-5), 291-298.
- Inacio, J. M., Marques, S., Nakamura, T., Shinohara, K., Meno, C., Hamada, H., & Belo, J. A. (2013). The Dynamic Right-to-Left Translocation of Cer12 Is Involved in the Regulation and Termination of Nodal Activity in the Mouse Node. *PLoS One*, 8(3): e60406. doi: 10.1371/journal.pone.0060406

- Inai, K., Norris, R. A., Hoffman, S., Markwald, R. R., & Sugi, Y. (2008). BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis. [Article]. *Developmental Biology*, 315(2), 383-396. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.12.028
- Inoue, T., Hatayama, M., Tohmonda, T., Itohara, S., Aruga, J., & Mikoshiba, K. (2004). Mouse *Zic5* deficiency results in neural tube defects and hypoplasia of cephalic neural crest derivatives. *Developmental Biology*, 270(1), 146-162. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.02.017
- Inoue, T., Ota, M., Mikoshiba, K., & Aruga, J. (2007). *Zic2* and *Zic3* synergistically control neurulation and segmentation of paraxial mesoderm in mouse embryo. *Developmental Biology*, 306(2), 669-684. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.04.003
- Isaac, A., Sargent, M. G., & Cooke, J. (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. [Article]. *Science*, 275(5304), 1301-1304.
- Ishii, Y., Garriock, R. J., Navetta, A. M., Coughlin, L. E., & Mikawa, T. (2010). BMP Signals Promote Proepicardial Protrusion Necessary for Recruitment of Coronary Vessel and Epicardial Progenitors to the Heart. *Developmental Cell*, 19(2), 307-316. doi: 10.1016/j.devcel.2010.07.017
- Ishii, Y., Langberg, J. D., Hurtado, R., Lee, S., & Mikawa, T. (2007). Induction of proepicardial marker gene expression by the liver bud. *Development*, 134(20), 3627-3637. doi: 10.1242/dev.005280
- Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., Wright, C. V. E., Hamada, H., Ohuchi, H., Noji, S. (2000). Asymmetric expression of *antivin/lefty1* in the early chick embryo. [Article]. *Mechanisms of Development*, 90(1), 115-118. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00232-4
- Itasaki, N., Nakamura, H., Sumida, H., & Yasuda, M. (1991). Actin bundles on the right side in the caudal part of the heart tube play a role in dextro-looping in the embryonic chick heart. [Article]. *Anatomy and Embryology*, 183(1), 29-39.
- Itasaki, N., Nakamura, H., & Yasuda, M. (1989). Changes in the arrangement of actin bundles during heart looping in the chick embryo. *Anatomy and Embryology*, 180(5), 413-420. doi: 10.1007/bf00305115
- Ivaska, J., Pallari, H. M., Nevo, J., & Eriksson, J. E. (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2050-2062. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.040
- Ivins, S., Chappell, J., Vernay, B., Suntharalingham, J., Martineau, A., Mohun, T. J., & Scambler, P. J. (2015). The CXCL12/CXCR4 Axis Plays a Critical Role in Coronary Artery Development. *Developmental Cell*, 33(4), 455-468. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.026
- Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M., Mekada, E. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3221-3226. doi: 10.1073/pnas.0537588100
- Jain, R., Engleka, K. A., Rentschler, S. L., Manderfield, L. J., Li, L., Yuan, L. J., & Epstein, J. A. (2011). Cardiac neural crest orchestrates remodeling and functional maturation of mouse semilunar valves. [Article]. *Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 422-430. doi: 10.1172/jci44244
- Jain, R., High, F. A., Stoller, J. Z., Antonucci, N. B., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2009). Jagged1/Notch Signaling in the Second Heart Field is Required for Proper Outflow Tract, Aortic Arch Artery, and Semilunar Valve Development. [Meeting Abstract]. *Circulation*, 120(18), S604-S604.
- Jamali, M., Karamboulas, C., Rogerson, P. J., & Skerjanc, I. S. (2001). BMP signaling regulates *Nkx2-5* activity during cardiomyogenesis. [Article]. *Febs Letters*, 509(1), 126-130.

- Jena, Universitätsklinikum from <http://www.htchirurgie.uniklinikum.jena.de/Herzchirurgie/Koronare+Herzkrankheit.html>, abgerufen am 2.9.2016
- Jenkins, M. W., Rothenberg, F., Roy, D., Nikolski, V. P., Hu, Z., Watanabe, M., Wilson, D.L., Efimov, I.R., Rollins, A. M. (2006). 4D embryonic cardiography using gated optical coherence tomography. *Optics Express*, 14(2), 736-748. doi: 10.1364/opex.14.000736
- Jenkins, S. J., Hutson, D. R., & Kubalak, S. W. (2005). Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RKR alpha(-/-) epicardium. *Developmental Dynamics*, 233(3), 1091-1101. doi: 10.1002/dvdy.20393
- Jensen, B., van der Wal, A. C., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2017). Excessive trabeculations in noncompaction do not have the embryonic identity. *International Journal of Cardiology*, 227, 325-330. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.089
- Jiang, G. H., Herron, T. J., Di Bernardo, J., Walker, K. A., O'Shea, K. S., & Kunisaki, S. M. (2016). Human Cardiomyocytes Prior to Birth by Integration-Free Reprogramming of Amniotic Fluid Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(12), 1595-1606. doi: 10.5966/sctm.2016-0016
- Jiang, X. B., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P., & Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. [Article]. *Development*, 127(8), 1607-1616.
- Jiao, K., Kulesa, H., Tompkins, K., Zhou, Y. N., Batts, L., Baldwin, H. S., & Hogan, B. L. M. (2003). An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. [Article]. *Genes & Development*, 17(19), 2362-2367. doi: 10.1101/gad.1124803
- Jie, Q. Q., Wang, D. Z., Liu, B. X., Li, Y., Luo, J. C., & Wei, Y. D. (2016). Age-related expression of calcium channels and related proteins in Ventricular Myocyte during embryonic heart development. *Journal of the American College of Cardiology*, 68(16), Supplement, C19-C19.
- Jin, Z. G., Ueba, H., Tanimoto, T., Lungu, A. O., Frame, M. D., & Berk, B. C. (2003). Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation Research*, 93(4), 354-363. doi: 10.1161/01.res.0000089257.94002.96
- Johnson, B., Bark, D., Van Herck, I., Garrity, D., & Dasi, L. P. (2015). Altered mechanical state in the embryonic heart results in time-dependent decreases in cardiac function. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 14(6), 1379-1389. doi: 10.1007/s10237-015-0681-1
- Jones, W. K., Sanchez, A., & Robbins, J. (1994). Murine pulmonary myocardium - developmental analysis of cardiac gene-expression. *Developmental Dynamics*, 200(2), 117-128.
- Jongbloed, M. R. M., Mahtab, E. A. F., Blom, N. A., Schalij, M. J., & Groot, A. (2008). Development of the cardiac conduction system and the possible relation to predilection sites of arrhythmogenesis. *The Scientific World Journal*, 8, 239-269. doi: 10.1100/tsw.2008.40
- Jongbloed, M. R. M., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Fishman, G. I., Wang, Z. Y., & Gittenberger-de Groot, A. C. (2004). Cardiac conduction system-L acZ expression in the atrioventricular ring and moderator band of Transgenic murine embryos: A developmental substrate for Wolff-Parkinson-White syndrome and Mahaim tachycardia? *Journal of the American College of Cardiology*, 43(5), 4A-5A. doi: 10.1016/s0735-1097(04)90016-2
- Joyce, E. M., Liao, J., Schoen, F. J., Mayer, J. E., & Sacks, M. S. (2009). Functional Collagen Fiber Architecture of the Pulmonary Heart Valve Cusp. [Article]. *Annals of Thoracic Surgery*, 87(4), 1240-1249. doi: 10.1016/j.athoracsur.2008.12.049
- Joyner, R. W., & van Capelle, F. J. (1986). Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. *Biophysical Journal*, 50(6), 1157-1164.
- Ju, Y. K., Liu, J., Lee, B. H., Lai, D. N., Woodcock, E. A., Lei, M., Cannel, M.B., Allen, D.

- G. (2011). Distribution and Functional Role of Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors in Mouse Sinoatrial Node. *Circulation Research*, 109(8), 848-866. doi: 10.1161/circresaha.111.243824
- Kaarbo, M., Crane, D. I., & Murrell, W. G. (2003). RhoA is highly up-regulated in the process of early heart development of the chick and important for normal embryogenesis. [Article]. *Developmental Dynamics*, 227(1), 35-47. doi: 10.1002/dvdy.10283
- Kamino, K., Hirota, A., & Fujii, S. (1981). Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature*, 290(5807), 595-597. doi: 10.1038/290595a0
- Kang, J., Nathan, E., Xu, S. M., Tzahor, E., & Black, B. L. (2009). Isl1 is a direct transcriptional target of Forkhead transcription factors in second heart field-derived mesoderm. [Article]. *Developmental Biology*, 334(2), 513-522. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.06.041
- Kano, M., Takeya, R., Abe, T., Kitajima, N., Nishida, M., Tominaga, R., Kurose, H., Sumimoto, H. (2012). Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biology open*, 1(9), 889-896. doi: 10.1242/bio.20121370
- Kanzawa, N., Poma, C. P., Takebayashi-Suzuki, K., Diaz, K. G., Layliev, J., & Mikawa, T. (2002). Competency of embryonic cardiomyocytes to undergo Purkinje fiber differentiation is regulated by endothelin receptor expression. *Development*, 129(13), 3185-3194.
- Kapacce, Z., Richardson, S. H., Lu, Y. H., Starborg, T., Holmes, D. F., Baar, K., & Kadler, K. E. (2008). Tension is required for fibroblast formation. [Article]. *Matrix Biology*, 27(4), 371-375. doi: 10.1016/j.matbio.2007.11.006
- Karppinen, S., Rapila, R., Makikallio, K., Hanninen, S. L., Rysa, J., Vuolteenaho, O., & Tavi, P. (2014). Endothelin-1 signalling controls early embryonic heart rate in vitro and in vivo. *Acta Physiologica*, 210(2), 369-380. doi: 10.1111/apha.12194
- Katsu, K., Tatsumi, N., Niki, D., Yamamura, K., & Yokouchi, Y. (2013). Multi-modal effects of BMP signaling on Nodal expression in the lateral plate mesoderm during left-right axis formation in the chick embryo. *Developmental Biology*, 374(1), 71-84. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.027
- Katsu, K., Tokumori, D., Tatsumi, N., Suzuki, A., & Yokouchi, Y. (2012). BMP inhibition by DAN in Hensen's node is a critical step for the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. *Developmental Biology*, 363(1), 15-26. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.015
- Kattan, J., Dettman, R. W., & Bristow, J. (2004). Formation and remodeling of the coronary vascular bed in the embryonic avian heart. *Developmental Dynamics*, 230(1), 34-43. doi: 10.1002/dvdy.20022
- Kattman, S. J., Adler, E. D., & Keller, G. M. (2007). Specification of Multipotential cardiovascular progenitor cell during embryonic stem cell differentiation and embryonic development. [Article]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 17(7), 240-246.
- Kattman, S. J., Huber, T. L., & Keller, G. M. (2006). Multipotent Flk-1(+) cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. [Article]. *Developmental Cell*, 11(5), 723-732. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.002
- Katz, T. C., Singh, M. K., Degenhardt, K., Rivera-Feliciano, J., Johnson, R. L., Epstein, J. A., & Tabin, C. J. (2012). Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells. *Developmental Cell*, 22(3), 639-650. doi: 10.1016/j.devcel.2012.01.012
- Kawasumi, A., Nakamura, T., Iwai, N., Yashiro, K., Saijoh, Y., Belo, J. A., Shiratori, H.,

- Hamada, H. (2011). Left-right asymmetry in the level of active Nodal protein produced in the node is translated into left-right asymmetry in the lateral plate of mouse embryos. *Developmental Biology*, 353(2), 321-330. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.03.009
- Keith, A., & Flack, M. (1907). The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *Journal of Anatomy and Physiology*, 41(Pt 3), 172-189.
- Kelly, K. A., Wei, Y., & Mikawa, T. (2002). Cell death along the embryo midline regulates left-right sidedness. [Article]. *Developmental Dynamics*, 224(2), 238-244. doi: 10.1002/dvdy.10098
- Kelly, R. G. (2005). Molecular inroads into the anterior heart field. [Review]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(2), 51-56.
- Kelly, R. G., Brown, N. A., & Buckingham, M. E. (2001). The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. [Article]. *Developmental Cell*, 1(3), 435-440.
- Kelly, R. G., & Buckingham, M. E. (2002). The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. [Review]. *Trends in Genetics*, 18(4), 210-216.
- Kelly, R. G., & Papaioannou, V. E. (2007). Visualization of outflow tract development in the absence of *tbx1* using an Fgf10 enhancer trap transgene. *Developmental Dynamics*, 236(3), 821-828. doi: 10.1002/dvdy.21063
- Kemler, A.G., Martin, J.E. (1972). Incidence of congenital cardiac defects in bovine fetuses. *American Journal of Veterinary Research*, 33(1), 249-251
- Kertesz, N., Wu, J., Chen, T. H. P., Sucov, H. M., & Wu, H. (2004). The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Developmental Biology*, 276(1), 101-110. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.025
- Keyte, A. L., Alonzo-Johnsen, M., & Hutson, M. R. (2014). Evolutionary and Developmental Origins of the Cardiac Neural Crest: Building a Divided Outflow Tract. *Birth Defects Research Part C-Embryo Today-Reviews*, 102(3), 309-323. doi: 10.1002/bdrc.21076
- Khudyakov, J., & Bronner-Fraser, M. (2009). Comprehensive Spatiotemporal Analysis of Early Chick Neural Crest Network Genes. *Developmental Dynamics*, 238(3), 716-723. doi: 10.1002/dvdy.21881
- Kidokoro, H., Okabe, M., & Tamura, K. (2008). Time-Lapse Analysis Reveals Local Asymmetrical Changes in C-Looping Heart Tube. [Article]. *Developmental Dynamics*, 237(12), 3545-3556. doi: 10.1002/dvdy.21662
- Kim, J. S., Viragh, S., Moorman, A. F. M., Anderson, R. H., & Lamers, W. H. (2001a). Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart. [Article]. *Circulation Research*, 88(4), 395-402.
- Kim, R. Y., Robertson, E. J., & Solloway, M. J. (2001b). Bmp6 and Bmp7 Are Required for Cushion Formation and Septation in the Developing Mouse Heart. *Developmental Biology*, 235(2), 449-466. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2001.0284>
- Kimura-Yoshida, C., Nakano, H., Okamura, D., Nakao, K., Yonemura, S., Belo, J. A., Aizawa, S., Matsui, Y., Matsuo, I. (2005). Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm. *Developmental Cell*, 9(5), 639-650. doi: 10.1016/j.devcel.2005.09.011
- Kinder, S. J., Loebel, D. A. F., & Tam, P. P. L. (2001). Allocation and Early Differentiation of Cardiovascular Progenitors in the Mouse Embryo. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11(5), 177-184. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00091-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00091-3)
- Kirby, M. L., Gale, T. F., & Stewart, D. E. (1983). Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*, 220(4601), 1059-1061. doi: 10.1126/science.6844926
- Kirby, M. L., & Hutson, M. R. (2010). Factors controlling cardiac neural crest cell migration.

- Cell Adhesion & Migration*, 4(4), 609-621. doi: 10.4161/cam.4.4.13489
- Kirby, M. L., Lawson, A., Stadt, H. A., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., McCraney, E., Waldo, K.L., Li, Y.X., Schoenwolf, G. C. (2003). Hensen's node gives rise to the ventral midline of the foregut: implications for organizing head and heart development. *Developmental Biology*, 253(2), 175-188. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00024-6
- Kirby, M. L., & Waldo, K. L. (1995). Neural crest and cardiovascular patterning. *Circulation Research*, 77(2), 211-215.
- Kirchhof, P., Kahr, P. C., Kaese, S., Piccini, I., Vokshi, I., Scheld, H. H., Roterling, H., Fortmueller, L., Laakmann, S., Verheule, S., Schotten, U., Fabritz, L., Brown, N. A. (2011). PITX2c Is Expressed in the Adult Left Atrium, and Reducing Pitx2c Expression Promotes Atrial Fibrillation Inducibility and Complex Changes in Gene Expression. *Circulation-Cardiovascular Genetics*, 4(2), 123-133. doi: 10.1161/circgenetics.110.958058
- Kirschner, K. M., Wagner, N., Wagner, K. D., Wellmann, S., & Scholz, H. (2006). The Wilms tumor suppressor Wt1 promotes cell adhesion through transcriptional activation of the alpha 4 integrin gene. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31930-31939. doi: 10.1074/jbc.M602668200
- Kitajima, K., Oki, S., Ohkawa, Y., Sumi, T., & Meno, C. (2013). Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Developmental Biology*, 380(2), 222-232. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.05.011
- Klaus, A., Muller, M., Schulz, H., Saga, Y., Martin, J. F., & Birchmeier, W. (2012). Wnt/beta-catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(27), 10921-10926. doi: 10.1073/pnas.1121236109
- Klewer, S. E., Yatskievych, T., Pogreba, K., Stevens, M. V., Antin, P. B., & Camenisch, T. D. (2006). Has2 expression in heart forming regions is independent of BMP signaling. *Gene Expression Patterns*, 6(5), 462-470. doi: 10.1016/j.modgep.2005.11.005
- Ko, Y. S., Yeh, H. I., Ko, Y. L., Hsu, Y. C., Chen, C. F., Wu, S. M., Lee, Y.S., Severs, N. J. (2004). Three-dimensional reconstruction of the rabbit atrioventricular conduction axis by combining histological, desmin, and connexin mapping data. *Circulation*, 109(9), 1172-1179. doi: 10.1161/01.cir.0000117233.57190.bd
- Kodama, I., Nikmaram, M. R., Boyett, M. R., Suzuki, R., Honjo, H., & Owen, J. M. (1997). Regional differences in the role of the Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 272(6), H2793-H2806.
- Kodo, K., Nishizawa, T., Furutani, M., Arai, S., Yamamura, E., Joo, K., Takahashi, T., Matsuoka, R., Yamagishi, H. (2009). GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13933-13938. doi: 10.1073/pnas.0904744106
- Kohl, P., Kamkin, A. G., Kiseleva, I. S., & Noble, D. (1994). Mechanosensitive fibroblasts in the sinoatrial node region of rat heart - interaction with cardiomyocytes and possible role. *Experimental Physiology*, 79(6), 943-956.
- Kolditz, D. P., Wijffels, M., Blom, N. A., van der Laarse, A., Hahurij, N. D., Lie-Venema, H., Markwald, R.R., Poelmann, R.E., Schalij, M.J., Gittenberger-de Groot, A. C. (2008). Epicardium-derived cells in development of annulus fibrosis and persistence of accessory pathways. [Article]. *Circulation*, 117(12), 1508-1517. doi: 10.1161/circulationaha.107.726315
- Kolditz, D. P., Wijffels, M., Van der Laarse, A., Markwald, R. R., Gittenberger-De Groot, A. C., & Schalij, M. J. (2007). Epicardium-Derived-Cells in annulus fibrosis development and persistence of accessory atrioventricular pathways. *European Heart Journal*, 28, 103-103.

- Kölliker, A. von (1879). *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere*. Verlag Engelmann, Leipzig, 2.Aufl., 1033 S.
- Korhonen, T., Hanninen, S. L., & Tavi, P. (2009). Model of Excitation-Contraction Coupling of Rat Neonatal Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 96(3), 1189-1209. doi: 10.1016/j.bpj.2008.10.026
- Kowalski, W. J., Dur, O., Wang, Y. J., Patrick, M. J., Tinney, J. P., Keller, B. B., & Pekkan, K. (2013). Critical Transitions in Early Embryonic Aortic Arch Patterning and Hemodynamics. [Article]. *PLoS One*, 8(3): e60271. doi: 10.1371/journal.pone.0060271
- Kowalski, W. J., Teslovich, N. C., Dur, O., Keller, B. B., & Pekkan, K. (2012). Computational hemodynamic optimization predicts dominant aortic arch selection is driven by embryonic outflow tract orientation in the chick embryo. [Article]. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(7), 1057-1073. doi: 10.1007/s10237-012-0373-z
- Kozlovsky, P., Bryson-Richardson, R. J., Jaffa, A. J., Rosenfeld, M., & Elad, D. (2016). The Driving Mechanism for Unidirectional Blood Flow in the Tubular Embryonic Heart. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(10), 3069-3083. doi: 10.1007/s10439-016-1620-8
- Kozłowski, D., Kozłuk, E., Adamowicz, M., Grzybiak, M., Walczak, F., & Walczak, E. (1998). Histological examination of the topography of the atrioventricular nodal artery within the triangle of Koch. *Pace-Pacing and Clinical Electrophysiology*, 21(1), 163-167. doi: 10.1111/j.1540-8159.1998.tb01081.x
- Kreuzberg, M. M., Sohl, G. S., Kim, J. S., Verselis, V. K., Willecke, K., & Bukauskas, F. F. (2005). Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circulation Research*, 96(11), 1169-1177. doi: 10.1161/01.res.0000169271.33675.05
- Kreuzberg, M. M., Willecke, K., & Bukauskas, F. F. (2006). Connexin-mediated cardiac impulse propagation: Connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16(8), 266-272. doi: 10.1016/j.tcm.2006.05.002
- Kruithof, B. P. T., Krawitz, S. A., & Gaussin, V. (2007). Atrioventricular valve development during late embryonic and postnatal stages involves condensation and extracellular matrix remodeling. [Article]. *Developmental Biology*, 302(1), 208-217. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.024
- Kruithof, B. P. T., van Wijk, B., Somi, S., Kruithof-de Julio, M., Pomares, J. M. P., Weesie, F., Wessels, A., Moorman, A.F.M., van den Hoff, M. J. B. (2006). BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Developmental Biology*, 295(2), 507-522. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.033
- Kubalak, S. W., Hutson, D. R., Scott, K. K., & Shannon, R. A. (2002). Elevated transforming growth factor beta 2 enhances apoptosis and contributes to abnormal outflow tract and aortic sac development in retinoic X receptor alpha knockout embryos. [Article]. *Development*, 129(3), 733-746.
- Kucera, J. P., Kleber, A. G., & Rohr, S. (2001). Slow conduction in cardiac tissue: Insights from optical mapping at the cellular level. *Journal of Electrocardiology*, 34, 57-64. doi: 10.1054/jelc.2001.28827
- Kumar, S., & Duyster, G. (2014). Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing Fgf8 transcription. *Development*, 141(15), 2972-2977. doi: 10.1242/dev.112367
- Kume, T., Jiang, H. Y., Topczewska, J. M., & Hogan, B. L. M. (2001). The murine winged helix transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. *Genes & Development*, 15(18), 2470-2482. doi: 10.1101/gad.907301

- Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Soudais, C., Leiden, J. M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. [Article]. *Genes & Development*, 11(8), 1048-1060.
- Kuratani, S. C., & Kirby, M. L. (1991). Initial migration and distribution of the cardiac neural crest in the avian embryo – an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. *American Journal of Anatomy*, 191(3), 215-227. doi: 10.1002/aja.1001910302
- Kurkiewicz, T. (1909). *Zur Histogenese des Herzmuskels der Wirbeltiere*. Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie, S. 148-191
- Kwang, S. J., Brugger, S. M., Lazik, A., Merrill, A. E., Wu, L. Y., Liu, Y. H., Ishii, M., Sangiorgi, F. O., Rauchman, M., Sucov, H. M., Maas, R. L., Maxson, R. E. (2002). Msx2 is an immediate downstream effector of Pax3 in the development of the murine cardiac neural crest. *Development*, 129(2), 527-538.
- Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H. M., Stewart, C. L., Buck, C., Buck, C. A., & Labow, M. A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in Vascular Cell-Adhesion Molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development*, 121(2), 489-503.
- Kwon, C., Arnold, J., Hsiao, E. C., Taketo, M. M., Conklin, B. R., & Srivastava, D. (2007). Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 10894-10899. doi: 10.1073/pnas.0704044104
- Kwon, C., Cordes, K. R., & Srivastava, D. (2008). Wnt/beta-catenin signaling acts at multiple developmental stages to promote mammalian cardiogenesis. [Article]. *Cell Cycle*, 7(24), 3815-3818.
- Kwon, C., Qian, L., Cheng, P., Nigam, V., Arnold, J., & Srivastava, D. (2009). A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate. *Nature Cell Biology*, 11(8), 951-957. doi: 10.1038/ncb1906
- Ladam, F., & Sagerstrom, C. G. (2014). Hox Regulation of Transcription: More Complex(es). *Developmental Dynamics*, 243(1), 4-15. doi: 10.1002/dvdy.23997
- Laforest, B., Andelfinger, G., & Nemer, M. (2011). Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2876-2887. doi: 10.1172/jci44555
- Legendijk, A. K., Szabo, A., Merks, R. M. H., & Bakkers, J. (2013). Hyaluronan: A critical regulator of endothelial-to-mesenchymal transition during cardiac valve formation. [Review]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(5), 135-142. doi: 10.1016/j.tcm.2012.10.002
- Lai, D., Liu, X. F., Forrai, A., Wolstein, O., Michalick, J., Ahmed, I., Garratt, A. N., Birchmeier, C., Zhou, M., Hartley, L., Robb, L., Feneley, M. P., Fatkin, D., Harvey, R. P. (2010). Neuregulin 1 Sustains the Gene Regulatory Network in Both Trabecular and Nontrabecular Myocardium. [Article]. *Circulation Research*, 107(6), 715-727. doi: 10.1161/circresaha.110.218693
- Lakatta, E. G., Vinogradova, T., Lyashkov, A., Sirenko, S., Zhu, W., Ruknudin, A., & Maltsev, V. A. (2006). The integration of spontaneous intracellular Ca<sup>2+</sup> cycling and surface membrane ion channel activation entrains normal automaticity in cells of the heart's pacemaker. In S. Sideman, R. Beyar & A. Landesberg (Eds.), *Interactive and Integrative Cardiology* Vol. 1080, 178-206.
- Lambrechts, D., & Carmeliet, P. (2004). Genetics in zebrafish, mice, and humans to dissect congenital heart disease: Insights in the role of VEGF. In G. P. Schatten (Ed.), *Developmental Vascular Biology*, Vol. 62, 189-224.
- Lamers, W. H., Dejong, F., Degroot, I. J. M., & Moorman, A. F. M. (1991). The development of the avian conduction system, a review. *European Journal of Morphology*, 29(4), 233-253.

- Lamers, W. H., Viragh, S., Wessels, A., Moorman, A. F. M., & Anderson, R. H. (1995). Formation of the tricuspid valve in the human heart. [Article]. *Circulation*, *91*(1), 111-121.
- Landerholm, T. E., Dong, X. R., Lu, J., Belaguli, N. S., Schwartz, R. J., & Majesky, M. W. (1999). A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. *Development*, *126*(10), 2053-2062.
- Lange, A. W., & Yutzey, K. E. (2006). NFATc1 expression in the developing heart valves is responsive to the RANKL pathway and is required for endocardial expression of cathepsin K. [Article]. *Developmental Biology*, *292*(2), 407-417. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.017
- Latacha, K. S., Remond, M. C., Ramasubramanian, A., Chen, A. Y., Elson, E. L., & Taber, L. A. (2005). Role of actin polymerization in bending of the early heart tube. [Article]. *Developmental Dynamics*, *233*(4), 1272-1286. doi: 10.1002/dvdy.20488
- Lavallee, G., Andelfinger, G., Nadeau, M., Lefebvre, C., Nemer, G., Horb, M. E., & Nemer, M. (2006). The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *Embo Journal*, *25*(21), 5201-5213. doi: 10.1038/sj.emboj.7601379
- Laverriere, A. C., Macneill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B. E., & Evans, T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(37), 23177-23184.
- Lavine, K. J., Long, F. X., Choi, K., Smith, C., & Ornitz, D. M. (2008). Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development*, *135*(18), 3161-3171. doi: 10.1242/dev.019919
- Lavine, K. J., White, A. C., Park, C., Smith, C. S., Choi, K., Long, F. X., Hu, C.C., Ornitz, D. M. (2006). Fibroblast growth factor signals regulate a wave of hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes & Development*, *20*(12), 1651-1666. doi: 10.1101/gad.1411406
- Lavine, K. J., Yu, K., White, A. C., Zhang, X. Q., Smith, C., Partanen, J., & Ornitz, D. M. (2005). Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Developmental Cell*, *8*(1), 85-95. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.002
- Lawson, A., & Schoenwolf, G. C. (2001a). Cell populations and morphogenetic movements underlying formation of the avian primitive streak and organizer. *Genesis*, *29*(4), 188-195. doi: 10.1002/gene.1023
- Lawson, K. A., Meneses, J. J., & Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, *113*(3), 891-911.
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., & Weinstein, B. M. (2001b). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, *128*(19), 3675-3683.
- Lawson, N. D., Vogel, A. M., & Weinstein, B. M. (2002). sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Developmental Cell*, *3*(1), 127-136. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00198-3
- le Noble, F., Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Djonov, V., Matthijsen, R., Breant, C., Fleury, V., Eichmann, A. (2004). Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development*, *131*(2), 361-375. doi: 10.1242/dev.00929
- Leda, M., Tsuchihashi, T., Ivey, K. N., Ross, R. S., Hong, T. T., Shaw, R. M., & Srivastava, D. (2009). Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through beta 1 Integrin Signaling. *Developmental Cell*, *16*(2), 233-244. doi: 10.1016/j.devcel.2008.12.007
- Lee, E. M., Yuan, T., Ballim, R. D., Nguyen, K., Kelsh, R. N., Medeiros, D. M., &

- McCauley, D. W. (2016). Functional constraints on SoxE proteins in neural crest development: The importance of differential expression for evolution of protein activity. *Developmental Biology*, 418(1), 166-178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.022>
- Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., & Hauser, C. (1995). Requirement for Neuregulin Receptor ErbB2 in neural and cardiac development. [Article]. *Nature*, 378(6555), 394-398. doi: 10.1038/378394a0
- Lehoux, S., Castier, Y., & Tedgui, A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *Journal of Internal Medicine*, 259(4), 381-392. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x
- Lei, L. M., Lin, H. M., Zhong, S. L., Zhang, Z. W., Chen, J. M., Yu, X. Y., Liu, X. Q., Zhang, C., Nie, Z. Q., Zhuang, J. (2017). DNA methyltransferase 1 rs16999593 genetic polymorphism decreases risk in patients with transposition of great arteries. *Gene*, 615, 50-56. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.012
- Lepore, J. J., Mericko, P. A., Cheng, L., Lu, M. M., Morrisey, E. E., & Parmacek, M. S. (2006). GATA-6 regulates semaphorin 3C and is required in cardiac neural crest for cardiovascular morphogenesis. [Article]. *Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 929-939. doi: 10.1172/JCI27363
- Lescroart, F., Chabab, S., Lin, X. H., Rulands, S., Paulissen, C., Rodolosse, A., Auer, H., Achouri, Y., Dubois, C., Bondue, A., Simons, B. D., Blanpain, C. (2014). Early lineage restriction in temporally distinct populations of Mespl progenitors during mammalian heart development. *Nature Cell Biology*, 16(9), 829-840. doi: 10.1038/ncb3024
- Lescroart, F., Kelly, R. G., Le Garrec, J. F., Nicolas, J. F., Meilhac, S. M., & Buckingham, M. (2010). Clonal analysis reveals common lineage relationships between head muscles and second heart field derivatives in the mouse embryo. *Development*, 137(19), 3269-3279. doi: 10.1242/dev.050674
- Lescroart, F., Mohun, T., Meilhac, S. M., Bennett, M., & Buckingham, M. (2012). Lineage Tree for the Venous Pole of the Heart Clonal Analysis Clarifies Controversial Genealogy Based on Genetic Tracing. [Article]. *Circulation Research*, 111(10), 1313-1322. doi: 10.1161/circresaha.112.271064
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., & Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. [Article]. *Cell*, 82(5), 803-814. doi: 10.1016/0092-8674(95)90477-8
- Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K. R., Nogi, T., & Mercola, M. (2002). Asymmetries in H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. [Article]. *Cell*, 111(1), 77-89. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00939-x
- Li, J., Greener, I. D., Inada, S., Nikolski, V. P., Yamamoto, M., Hancox, J. C., Zhang, H. G., Billeter, R., Efimov, I. R., Dobrzynski, H., Boyett, M. R. (2008). Computer three-dimensional reconstruction of the atrioventricular node. *Circulation Research*, 102(8), 975-985. doi: 10.1161/circresaha.108.172403
- Li, P., Cavallero, S., Gu, Y., Chen, T. H. P., Hughes, J., Hassan, A. B., Bruning, J. C., Pashmforoush, M., Sucov, H. M. (2011). IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development. [Article]. *Development*, 138(9), 1795-1805. doi: 10.1242/dev.054338
- Li, P., Pashmforoush, M., & Sucov, H. M. (2010). Retinoic Acid Regulates Differentiation of the Secondary Heart Field and TGF beta-Mediated Outflow Tract Septation. [Article]. *Developmental Cell*, 18(3), 480-485. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.019
- Li, P., Yin, X., Shi, L., Rugonyi, S., & Wang, R. K. K. (2012). In vivo functional imaging of blood flow and wall strain rate in outflow tract of embryonic chick heart using ultrafast spectral domain optical coherence tomography. [Article]. *Journal of Biomedical Optics*, 17(9): 096006. doi: 10.1117/1.jbo.17.9.096006
- Li, Q., Guo, Z. K., Chang, Y. Q., Yu, X., Li, C. X., & Li, H. (2015). Gata4, Tbx5 and Baf60c

- induce differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into beating cardiomyocytes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 66, 30-36. doi: 10.1016/j.biocel.2015.06.008
- Li, Y., Wang, X. Y., Ma, Z. L., Chuai, M. L., Munsterberg, A., Lee, K. K., & Yang, X. S. (2014). Endoderm contributes to endocardial composition during cardiogenesis. *Chinese Science Bulletin*, 59(22), 2749-2755. doi: 10.1007/s11434-014-0366-7
- Liang, S., Li, H. C., Wang, Y. X., Wu, S. S., Cai, Y. J., Cui, H. L., Yang, Y.P., Ya, J. (2014). Pulmonary endoderm, second heart field and the morphogenesis of distal outflow tract in mouse embryonic heart. [Article]. *Development Growth & Differentiation*, 56(4), 276-292. doi: 10.1111/dgd.12129
- Liang, X. Q., Wang, G., Lin, L. Z., Lowe, J., Zhang, Q. Q., Bu, L., Chen, Y.H., Chen, J., Evans, S. M. (2013). HCN4 Dynamically Marks the First Heart Field and Conduction System Precursors. *Circulation Research*, 113(4), 399-407. doi: 10.1161/circresaha.113.301588
- Liebner, S., Cattelino, A., Gallini, R., Rudini, N., Iurlaro, M., Piccolo, S., & Dejana, E. (2004).  $\beta$ -Catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *The Journal of Cell Biology*, 166(3), 359-367. doi: 10.1083/jcb.200403050
- Lie-Venema, H., Eralp, I., Markwald, R. R., van den Akker, N. M. S., Wijffels, M. C. E. F., Kolditz, D. P., van der Laarse, A., Schaliij, M. J., Poelmann, R. E., Bogers, A. J. J. C., Gittenberger-de Groot, A. C. (2008). Periostin expression by epicardium-derived cells is involved in the development of the atrioventricular valves and fibrous heart skeleton. *Differentiation*, 76(7), 809-819. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00262.x>
- Lie-Venema, H., Gittenberger-de Groot, A. C., van Empel, L. J. P., Boot, M. J., Kerkdijk, H., de Kant, E., & DeRuiter, M. C. (2003). Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. *Circulation Research*, 92(7), 749-756. doi: 10.1161/01.res.0000066662.70010.db
- Lie-Venema, H., van den Akker, N. M. S., Bax, N. A. M., Winter, E. M., Maas, S., Kekarainen, T., Hoeben, R.C., DeRuiter, M.C., Poelmann, R.E., Groot, C. G. (2007). Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. [Review]. *TheScientificWorldJournal*, 7, 1777-1798. doi: 10.1100/tsw.2007.294
- Lin, C. Y., Lin, C. J., Chen, C. H., Chen, R. M., Zhou, B., & Chang, C. P. (2012a). The secondary heart field is a new site of calcineurin/Nfatc1 signaling for semilunar valve development. [Article]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 1096-1102. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.01.013
- Lin, F. J., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2007). Artery and vein formation: a tug of war between different forces. *Embo Reports*, 8(10), 920-924. doi: 10.1038/sj.embor.7401076
- Lin, F. J., You, L. R., Yu, C. T., Hsu, W. H., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2012b). Endocardial Cushion Morphogenesis and Coronary Vessel Development Require Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 32(11), E135-+. doi: 10.1161/atvbaha.112.300255
- Lin, L. Z., Cui, L., Zhou, W. L., Dufort, D., Zhang, X. X., Cai, C. L., Bu, L., Yang, L., Martin, J., Kemler, R., Rosenfeld, M. G., Chen, J., Evans, S. M. (2007). beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9313-9318. doi: 10.1073/pnas.0700923104
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., & Olson, E. N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. [Article]. *Science*, 276(5317), 1404-1407.

- Lin, Y. F., Swinburne, I., & Yelon, D. (2012c). Multiple influences of blood flow on cardiomyocyte hypertrophy in the embryonic zebrafish heart. [Article]. *Developmental Biology*, 362(2), 242-253. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.005
- Linask, K. K. (1992). N-Cadherin localization in early heart development and polar expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and Integrin during pericardial coelom formation and epithelialization of the differentiating myocardium. [Article]. *Developmental Biology*, 151(1), 213-224.
- Linask, K. K., Gui, Y. H., Rasheed, R., & Kwon, L. (1992). Pattern development during pericardial coelom formation and specification of the cardiomyocyte cell population by N-Cadherin and the Drosophila Armadillo protein homolog in in the early chick embryo. *Molecular Biology of the Cell*, 3, A206-A206.
- Linask, K. K., Han, M. D., Artman, M., & Ludwig, C. A. (2001). Sodium-calcium exchanger (NCX-1) and calcium modulation: NCX protein expression patterns and regulation of early heart development. [Article]. *Developmental Dynamics*, 221(3), 249-264.
- Linask, K. K., Han, M. D., Cai, D. H., Brauer, P. R., & Maisastry, S. M. (2005). Cardiac morphogenesis: Matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping. [Article]. *Developmental Dynamics*, 233(3), 739-753. doi: 10.1002/dvdy.20377
- Linask, K. K., Han, M. D., Linask, K. L., Schlange, T., & Brand, T. (2003). Effects of antisense misexpression of CFC on downstream flectin protein expression during heart looping. [Article]. *Developmental Dynamics*, 228(2), 217-230. doi: 10.1002/dvdy.10383
- Linask, K. K., Knudsen, K. A., & Gui, Y. H. (1997). N-cadherin-catenin interaction: Necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. [Article]. *Developmental Biology*, 185(2), 148-164.
- Linask, K. K., & Lash, J. W. (1988). A role for fibronectin in the migration of precardiac cells. 1. Dose-dependent effects of fibronectin antibody. *Developmental Biology*, 129(2), 315-323. doi: 10.1016/0012-1606(88)90378-8
- Linask, K. K., & Lash, J. W. (1993). Early Heart Development - Dynamics of Endocardial Cell Sorting Suggests a Common Origin with Cardiomyocytes. [Article]. *Developmental Dynamics*, 196(1), 62-69.
- Linask, K. K., & VanAuker, M. (2007). A role for the cytoskeleton in heart looping. [Review]. *TheScientificWorldJournal*, 7, 280-297. doi: 10.1100/tsw.2007.87
- Linask, K. K., Yu, X. Y., Chen, Y. P., & Han, M. D. (2002). Directionality of heart looping: Effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Developmental Biology*, 246(2), 407-417. doi: 10.1006/dbio.2002.0661
- Lincoln, J., Alfieri, C. M., & Yutzey, K. E. (2004). Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. [Article]. *Developmental Dynamics*, 230(2), 239-250. doi: 10.1002/dvdy.20051
- Lincoln, J., Alfieri, C. M., & Yutzey, K. E. (2006). BMP and FGF regulatory pathways control cell lineage diversification of heart valve precursor cells. [Article]. *Developmental Biology*, 292(2), 290-302. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.042
- Lincoln, J., Kist, R., Scherer, G., & Yutzey, K. E. (2007). Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development. *Developmental Biology*, 305(1), 120-132. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.02.002
- Lindhahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P., & Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242-245. doi: 10.1126/science.277.5323.242
- Lindsey, S. E., Menon, P. G., Kowalski, W. J., Shekhar, A., Yalcin, H. C., Nishimura, N., Schaffer, C.B., Butcher, J.T., Pekkan, K. (2015). Growth and hemodynamics after early embryonic aortic arch occlusion. *Biomechanics and Modeling in*

- Mechanobiology*, 14(4), 735-751. doi: 10.1007/s10237-014-0633-1
- Lindsley, R. C., Gill, J. G., Murphy, T. L., Langer, E. M., Cai, M., Mashayekhi, M., Wang, W., Niwa, N., Nerbonne, J.M., Kyba, M., Murphy, K. M. (2008). Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell*, 3(1), 55-68. doi: 10.1016/j.stem.2008.04.004
- Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., Hintze, T. H., Kajstura, J., Anversa, P. (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8966-8971. doi: 10.1073/pnas.0502678102
- Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I., & Harvey, R. P. (1993). Nkx-2.5 - a Novel Murine Homeobox Gene Expressed in Early Heart Progenitor Cells and Their Myogenic Descendants (Vol 119, Pg 419, 1993). [Correction, Addition]. *Development*, 119(3), 969-969.
- Liu, A. P., Nickerson, A., Troyer, A., Yin, X., Cary, R., Thornburg, K., Wang, R.K., Rugonyi, S. (2011). Quantifying blood flow and wall shear stresses in the outflow tract of chick embryonic hearts. [Article]. *Computers & Structures*, 89(11-12), 855-867. doi: 10.1016/j.compstruc.2011.03.003
- Liu, A. P., Rugonyi, S., Pentecost, J. O., & Thornburg, K. L. (2007a). Finite element modeling of blood flow-induced mechanical forces in the outflow tract of chick embryonic hearts. [Article; Proceedings Paper]. *Computers & Structures*, 85(11-14), 727-738. doi: 10.1016/j.compstruc.2007.01.014
- Liu, A. P., Wang, R. K. K., Thornburg, K. L., & Rugonyi, S. (2009a). Dynamic variation of hemodynamic shear stress on the walls of developing chick hearts: computational models of the heart outflow tract. [Article; Proceedings Paper]. *Engineering with Computers*, 25(1), 73-86. doi: 10.1007/s00366-008-0107-0
- Liu, C. Y., Liu, W., Palie, J., Lu, M. F., Brown, N. A., & Martin, J. F. (2002). Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions. *Development*, 129(21), 5081-5091.
- Liu, H., Zhang, W. B., Kennard, S., Caldwell, R. B., & Lilly, B. (2010). Notch3 Is Critical for Proper Angiogenesis and Mural Cell Investment. *Circulation Research*, 107(7), 860-870. doi: 10.1161/circresaha.110.218271
- Liu, J., Dobrzynski, H., Yanni, J., Boyett, M. R., & Lei, M. (2007b). Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovascular Research*, 73(4), 729-738. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.11.016
- Liu, L., Lei, I., & Wang, Z. (2016a). Improving cardiac reprogramming for heart regeneration. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 21(6), 588-594. doi: 10.1097/mot.0000000000000363
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A. H., Qi, X. X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development*, 22(23), 3242-3254. doi: 10.1101/gad.1738708
- Liu, P. T., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., & Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics*, 22(4), 361-365.
- Liu, W., Selever, J., Wang, D. G., Lu, M. F., Moses, K. A., Schwartz, R. J., & Martin, J. F. (2004). Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4489-4494. doi: 10.1073/pnas.0308466101
- Liu, W. F., Kim, K. H., Mo, R., Zhou, Y. Q., van Eede, M., Bruneau, B., Henkelmann, F., Hui, C. C. (2016b). A Novel Mouse Model of Left Ventricular Noncompaction: Iroquois Homeobox Genes 3 and 4 Are Required for Ventricular Compaction.

- Liu, Y., Lu, X. R., Xiang, F. L., Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., Robbins, J., & Feng, Q. P. (2014). Nitric oxide synthase-3 deficiency results in hypoplastic coronary arteries and postnatal myocardial infarction. *European Heart Journal*, 35(14), 920-930. doi: 10.1093/eurheartj/ehs306
- Liu, Z. Q., Li, T., Liu, Y. N., Jia, Z. Q., Li, Y. M., Zhang, C. G., Chen, P., Ma, K.T., Affara, N., Zhou, C. Y. (2009b). WNT signaling promotes Nkx2.5 expression and early cardiomyogenesis via downregulation of Hdac1. [Article]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793(2), 300-311. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.08.013
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., & Schoenwolf, G. C. (2001). Localization of cells of the prospective neural plate, heart and somites within the primitive streak and epiblast of avian embryos at intermediate primitive-streak stages. [Article]. *Cells Tissues Organs*, 169(4), 334-346.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Masa, N., Ganan, C. M., & Garcia-Martinez, V. (2009). Movement and commitment of primitive streak precardiac cells during cardiogenesis. [Article]. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8-10), 1445-1455. doi: 10.1387/ijdb.072417cl
- Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V. E., Potter, S. S., Overbeek, P., Kuehn, M. R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature*, 381(6578), 158-161. doi: 10.1038/381158a0
- Lu, M. F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature*, 401(6750), 276-278.
- Lu, W. H., Wang, G., Li, Y., Li, S., Song, X. Y., Wang, X. Y., Li, Y., Li, S., Song, X. Y., Wang, X. Y., Chuai, M., Lee, K. K. H., Cao, L., Yang, X. S. (2014). Autophagy functions on EMT in gastrulation of avian embryo. *Cell Cycle*, 13(17), 2752-2764. doi: 10.4161/15384101.2015.945850
- Lu, Y., James, T. N., Bootsma, M., & Terasaki, F. (1993). Histological organization of the right and left atrioventricular valves of the chicken heart and their relationship to the atrioventricular Purkinje Ring and the middle Bundle Branch. *Anatomical Record*, 235(1), 74-86. doi: 10.1002/ar.1092350108
- Lucitti, J. L., Jones, E. A. V., Huang, C. Q., Chen, J., Fraser, S. E., & Dickinson, M. E. (2007). Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development*, 134(18), 3317-3326. doi: 10.1242/dev.02883
- Lucitti, J. L., Visconti, R., Novak, J., & Keller, B. B. (2006). Increased arterial load alters aortic structural and functional properties during embryogenesis. [Article]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1919-H1926. doi: 10.1152/ajpheart.01061.2005
- Luna-Zurita, L., Prados, B., Grego-Bessa, J., Luxan, G., del Monte, G., Benguria, A., Adams, R.H., Perez-Pomares, J.M., de la Pompa, J. L. (2010). Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3493-3507. doi: 10.1172/jci42666
- Luna-Zurita, L., Stirnimann, C. U., Glatt, S., Kaynak, B. L., Thomas, S., Baudin, F., Samee, M. A. H., He, D., Small, E. M., Mileikovsky, M., Nagy, A., Holloway, A. K., Pollard, K. S., Muller, C. W., Bruneau, B. G. (2016). Complex Interdependence Regulates Heterotypic Transcription Factor Distribution and Coordinates Cardiogenesis. *Cell*, 164(5), 999-1014. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.004
- Lux, C. T., Yoshimoto, M., McGrath, K., Conway, S. J., Palis, J., & Yoder, M. C. (2008). All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac. *Blood*, 111(7), 3435-3438. doi:

10.1182/blood-2007-08-107086

- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R. L., Andrews, J. E., Robb, L., & Harvey, R. P. (1995). Myogenic and Morphogenetic Defects in the Heart Tubes of Murine Embryos Lacking the Homeo Box Gene *Nkx2-5*. [Article]. *Genes & Development*, 9(13), 1654-1666.
- Ma, H. Y., Xu, J., Eng, D., Gross, M. K., & Kioussi, C. (2013). *Pitx2*-Mediated Cardiac Outflow Tract Remodeling. [Article]. *Developmental Dynamics*, 242(5), 456-468. doi: 10.1002/dvdy.23934
- Ma, L. J., Lu, M. F., Schwartz, R. J., & Martin, J. F. (2005). *Bmp2* is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. [Article]. *Development*, 132(24), 5601-5611. doi: 10.1242/dev.02156
- Ma, P., Gu, S., Karunamuni, G. H., Jenkins, M. W., Watanabe, M., & Rollins, A. M. (2016). Cardiac neural crest ablation results in early endocardial cushion and hemodynamic flow abnormalities. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 311(5), H1150-H1159. doi: 10.1152/ajpheart.00188.2016
- Ma, Q., Zhou, B., & Pu, W. T. (2008). Reassessment of *Isl1* and *Nkx2-5* cardiac fate maps using a *Gata4*-based reporter of *Cre* activity. *Developmental Biology*, 323(1), 98-104. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.08.013
- MacGrogan, D., D'Amato, G., Travisano, S., Martinez-Poveda, B., Luxan, G., del Monte-Nieto, G., Papoutsis, T., Sbroglio, M., Bou, V., Gomez-del Arco, P., Gomez, M. J., Zhou, B., Redondo, J. M., Jimenez-Borreguero, L. J., de la Pompa, J. L. (2016). Sequential Ligand-Dependent Notch Signaling Activation Regulates Valve Primordium Formation and Morphogenesis. *Circulation Research*, 118(10), 1480-1497. doi: 10.1161/circresaha.115.308077
- Mackaay, A. J. C., Bleeker, W. K., Opthof, T., & Bouman, L. N. (1980a). Temperature-dependence of the chronotropic of calcium-functional inhomogeneity of the rabbit sinus node. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 12(5), 433-443. doi: 10.1016/0022-2828(80)90001-2
- Mackaay, A. J. C., Hof, T. O., Bleeker, W. K., Jongasma, H. J., & Bouman, L. N. (1980b). Interaction of adrenaline and acetylcholine on cardiac pacemaker function – functional inhomogeneity of the rabbit sinus node. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 214(2), 417-422.
- Madabhushi, M., & Lacy, E. (2011). Anterior Visceral Endoderm Directs Ventral Morphogenesis and Placement of Head and Heart via *BMP2* Expression. *Developmental Cell*, 21(5), 907-919. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.027
- Mahtab, E. A. F., Vicente-Steijn, R., Hahurij, N. D., Jongbloed, M. R. M., Wisse, L. J., DeRuiter, M. C., Uhrin, P., Zaujec, J., Binder, B. R., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C. (2009). Podoplanin Deficient Mice Show a RhoA-Related Hypoplasia of the Sinus Venosus Myocardium Including the Sinoatrial Node. [Article]. *Developmental Dynamics*, 238(1), 183-193. doi: 10.1002/dvdy.21819
- Mahtab, E. A. F., Wijffels, M., Van den Akker, N. M. S., Hahurij, N. D., Lie-Venema, H., Wisse, L. J., DeRuiter, M. C., Uhrin, P., Zaujec, J., Binder, B. R., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Gittenberger-De Groot, A. C. (2008). Cardiac malformations and myocardial abnormalities in Podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. [Article]. *Developmental Dynamics*, 237(3), 847-857. doi: 10.1002/dvdy.21463
- Malo, M. E., & Fliegel, L. (2006). Physiological role and regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(11), 1081-1095. doi: 10.1139/y06-065
- Manasek, F. J. (1969). Embryonic development of the heart. 2. Formation of the epicardium. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 22, 333-&
- Manasek, F. J., Burnside, M. B., & Waterman, R. E. (1972). Myocardial cell shape change as

- a mechanism of embryonic heart looping. [Article]. *Developmental Biology*, 29(4), 349-371. doi: 10.1016/0012-1606(72)90077-2
- Manasek, F. K., RR; Nakamura, A; Nguyenphuc, Q; Lactis, JW; Zak, R. (1984). Early heart development: a new model of cardiac morphogenesis *Growth of the Heart in Health and Disease* (pp. 105-130): Raven Press, New York
- Mangoni, M. E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J., & Nargeot, J. (2006a). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: From ionic currents to genes. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 90(1-3), 38-63. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.003
- Mangoni, M. E., & Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological Reviews*, 88(3), 919-982. doi: 10.1152/physrev.00018.2007
- Mangoni, M. E., Striessnig, J., Platzer, J., & Nargeot, J. (2001). Pacemaker currents in mouse sino-atrial node pacemaker cells. *Circulation*, 104(17), 218-218.
- Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A. L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H. S., Escande, D., Charpentier, F., Nargeot, J., Lory, P. (2006b). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca(V)<sub>3.1</sub>/α(1G) T-type calcium channels. *Circulation Research*, 98(11), 1422-1430. doi: 10.1161/01.res.0000225862.14314.49
- Manjunath, C. K., & Page, E. (1985). Cell biology and protein composition of cardiac gap junctions. *American Journal of Physiology*, 248(6), H783-H791.
- Manner, J. (1992). The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anatomy and Embryology*, 186(4), 379-385.
- Manner, J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: A morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. [Article]. *Anatomical Record*, 259(3), 248-262. doi: 10.1002/1097-0185(20000701)259:3<248::aid-ar30>3.0.co;2-k
- Manner, J. (2004). On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: New insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. [Article]. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 278A(1), 481-492. doi: 10.1002/ar.a.20036
- Manner, J. (2009). The Anatomy of Cardiac Looping: A Step Towards the Understanding of the Morphogenesis of Several Forms of Congenital Cardiac Malformations. [Review]. *Clinical Anatomy*, 22(1), 21-35. doi: 10.1002/ca.20652
- Manner, J. (2013). On the form problem of embryonic heart loops, its geometrical solutions, and a new biophysical concept of cardiac looping. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 195(4), 312-323. doi: 10.1016/j.aanat.2013.02.008
- Männer, J. (1993). Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anatomical Embryology* (187), 281- 289.
- Männer, J. (1999). Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. [Review]. *The Anatomical Record*, 255(2), 212-226.
- Manner, J., & Merkel, N. (2007). Early morphogenesis of the sinuatrial region of the chick heart: A contribution to the understanding of the pathogenesis of direct pulmonary venous connections to the right atrium and atrial septal defects in hearts with right isomerism of the atrial appendages. [Article]. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(2), 168-180. doi: 10.1002/ar.a.20418
- Männer, J., Perez-Pomares, J. M., Macias, D., & Munoz-Chapuli, R. (2001). The origin, formation and developmental significance of the epicardium: A review. *Cells, Tissues, Organs*, 169(2), 89-103.
- Manner, J., Seidl, W., & Steding, G. (1993). Correlation between the embryonic head flexures and cardiac development – an experimental study in chick embryos. *Anatomy and*

- Embryology*, 188(3), 269-285.
- Manner, J., Seidl, W., & Steding, G. (1995). The role of extracardiac factors in normal and abnormal development of the chick embryo heart - cranial flexure and ventral thoracic wall. *Anatomy and Embryology*, 191(1), 61-72.
- Manner, J., Wessel, A., & Yelbuz, T. M. (2010). How Does the Tubular Embryonic Heart Work? Looking for the Physical Mechanism Generating Unidirectional Blood Flow in the Valveless Embryonic Heart Tube. [Review]. *Developmental Dynamics*, 239(4), 1035-1046. doi: 10.1002/dvdy.22265
- Manning, A., & McLachlan, J. C. (1990). Looping of chick embryo hearts in vitro. *Journal of Anatomy*, 168, 257-263.
- Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H. Y., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., Demolombe, S. (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *Journal of Physiology-London*, 562(1), 223-234. doi: 10.1113/jphysiol.2004.074047
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., & Bank, H. (1975). Organization of extracellular matrix (ECM) in developing cardiac mesenchyme. [Meeting Abstract]. *Journal of Cell Biology*, 67(2), A262-A262.
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., Bolender, D. L., & Bernanke, D. H. (1979). Structural analysis of cell-matrix association during the morphogenesis of atrioventricular cushion tissue. *Developmental Biology*, 69(2), 634-654. doi: 10.1016/0012-1606(79)90317-8
- Markwald, R. R., Fitzharris, T. P., & Manasek, F. J. (1977). Structural development of endocardial cushions. [Article]. *American Journal of Anatomy*, 148(1), 85-119. doi: 10.1002/aja.1001480108
- Marques, S., Borges, A. C., Silva, A. C., Freitas, S., Cordenonsi, M., & Belo, J. A. (2004). The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes & Development*, 18(19), 2342-2347. doi: 10.1101/gad.306504
- Marques, S. R., & Yelon, D. (2009). Differential requirement for BMP signaling in atrial and ventricular lineages establishes cardiac chamber proportionality. [Article]. *Developmental Biology*, 328(2), 472-482. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.02.010
- Martin, E. W. (1960). The development of the vascular system in 5-somite to 21-somite dog embryos. *Anatomical Record*, 137(3), 378-378.
- Martinez-Estrada, O. M., Lettice, L. A., Essafi, A., Guadix, J. A., Slight, J., Velecela, V., Hall, E., Reichmann, J., Devenney, P. S., Hohenstein, P., Hosen, N., Hill, R. E., Munoz-Chapuli, R., Hastie, N. D. (2010). Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nature Genetics*, 42(1), 89-95. doi: 10.1038/ng.494
- Martinez-Lagunas, K., Fleischmann, B., & Hesse, M. (2017). in vivo detection of programmed cell death during mouse heart development. *Acta Physiologica*, 219, 38-38.
- Martinsen, B. J. (2005). Reference guide to the stages of chick heart embryology. [Review]. *Developmental Dynamics*, 233(4), 1217-1237. doi: 10.1002/dvdy.20468
- Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M., & Lassar, A. B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. [Article]. *Genes & Development*, 15(3), 316-327.
- Masani, F. (1986). Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats – an ultrastructural study. *Journal of Anatomy*, 145, 133-142.
- Matsui, H., Ikeda, K., Nakatani, K., Sakabe, M., Yamagishi, T., Nakanishi, T., & Nakajima, Y. (2005). Induction of initial cardiomyocyte alpha-actin - Smooth muscle alpha-actin - in cultured avian pregastrula epiblast: A role for nodal and BMP antagonist. [Article]. *Developmental Dynamics*, 233(4), 1419-1429. doi: 10.1002/dvdy.20477
- Matsui, H., Sakabe, M., Sakata, H., Nakatani, K., Ikeda, K., Fukui, M., Ando, K., Yamagishi,

- T., Nakajima, Y. (2006). Heart myofibrillogenesis occurs in isolated chick posterior blastoderm: A culture model. [Article]. *Acta Histochemica Et Cytochemica*, 39(5), 139-144. doi: 10.1267/ahc.06009
- Matsui, H., Sakabe, M., Sakata, H., Yanagawa, N., Ikeda, K., Yamagishi, T., & Nakajima, Y. (2008). Induction of initial heart alpha-actin, smooth muscle alpha-actin, in chick pregastrula epiblast: The role of hypoblast and fibroblast growth factor-8. [Article]. *Development Growth & Differentiation*, 50(3), 143-157. doi: 10.1111/j.1440-169x.2008.00987.x
- McCulley, D. J., Kang, J. O., Martin, J. F., & Black, B. L. (2008). BMP4 Is Required in the Anterior Heart Field and Its Derivatives for Endocardial Cushion Remodeling, Outflow Tract Septation, and Semilunar Valve Development. [Article]. *Developmental Dynamics*, 237(11), 3200-3209. doi: 10.1002/dvdy.21743
- McFadden, D. G., Barbosa, A. C., Richardson, J. A., Schneider, M. D., Srivastava, D., & Olson, E. N. (2005). The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development*, 132(1), 189-201. doi: 10.1242/dev.01562
- 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(1), 61-73. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00511-7
- McGready, T. A., Quinn, P. G., FitzPatrick, E. S., & Ryan, M. T. (Eds.). (2006). *Veterinary Embryology* (Vol. 1): Blackwell Publishing, Oxford.
- Meijler, F. L., & Janse, M. J. (1988). Morphology and electrophysiology of the mammalian atrioventricular node. *Physiological Reviews*, 68(2), 608-647.
- Meilhac, S. M., Esner, M., Kelly, R. G., Nicolas, J. F., & Buckingham, M. E. (2004a). The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. [Article]. *Developmental Cell*, 6(5), 685-698.
- Meilhac, S. M., Esner, M., Kerszberg, M., Moss, J. E., & Buckingham, M. E. (2004b). Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis. [Article]. *Journal of Cell Biology*, 164(1), 97-109. doi: 10.1083/jcb.200309160
- Meilhac, S. M., Kelly, R. G., Rocancourt, D., Eloy-Trinquet, S., Nicolas, J. F., & Buckingham, M. E. (2003). A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development*, 130(16), 3877-3889. doi: 10.1242/dev.00580
- Mellgren, A. M., Smith, C. L., Olsen, G. S., Eskiocak, B., Zhou, B., Kazi, M. N., Ruiz, F.R., Pu, W.T., Tallquist, M. D. (2008). Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta Signaling Is Required for Efficient Epicardial Cell Migration and Development of Two Distinct Coronary Vascular Smooth Muscle Cell Populations. [Article]. *Circulation Research*, 103(12), 1393-1401. doi: 10.1161/circresaha.108.176768
- Mello, W. C. D. (1963). Role of chloride ions in cardiac action and pacemaker potentials. *American Journal of Physiology*, 205(3), 567-575.
- Mendes, R. V., Martins, G. G., Cristovao, A. M., & Saude, L. (2014). N-Cadherin locks left-right asymmetry by ending the leftward movement of Hensen's node cells. *Developmental Cell*, 30(3), 353-360. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.010
- Meno, C., Takeuchi, J., Sakuma, R., Koshiha-Takeuchi, K., Ohishi, S., Saijoh, Y., Miyazaki, J., ten Dijke, P., Ogura, T., Hamada, H. (2001). Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2. *Developmental Cell*, 1(1), 127-138. doi: 10.1016/s1534-5807(01)00006-5
- Mercola, M., & Levin, M. (2001). Left-right asymmetry determination in vertebrates. [Review]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 779-805. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.779
- Merki, E., Zamora, L., Raya, A., Kawakami, Y., Wang, J. M., Zhang, X. X., Burch, J.,

- Kubalak, S.W., Kaliman, P., Belmonte, J.C.I., Chien, K.R., Ruiz-Lozano, P. (2005). Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18455-18460. doi: 10.1073/pnas.0504343102
- Merrick, A. F., Yacoub, M. H., Ho, S. Y., & Anderson, R. H. (2000). Anatomy of the muscular subpulmonary infundibulum with regard to the Ross procedure. [Article]. *Annals of Thoracic Surgery*, 69(2), 556-561. doi: 10.1016/s0003-4975(99)01300-4
- Mery, A., Aimond, F., Menard, C., Mikoshiba, K., Michalak, M., & Puceat, M. (2005). Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), 2414-2423. doi: 10.1091/mbc.E04-10-0883
- Meyers, E. N., & Martin, G. R. (1999). Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: Functions of FGF8 and SHH. [Article]. *Science*, 285(5426), 403-406.
- Meysen, S., Marger, L., Hewett, K. W., Jarry-Guichard, T., Agarkova, I., Chauvin, J. P., . . . Miquerol, L. (2007). Nkx2.5 cell-autonomous gene function is required for the postnatal formation of the peripheral ventricular conduction system. *Developmental Biology*, 303(2), 740-753. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.044
- Mickoleit, M., Schmid, B., Weber, M., Fahrbach, F. O., Hombach, S., Reischauer, S., & Huisken, J. (2014). High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart. *Nature Methods*, 11(9), 919-922. doi: 10.1038/nmeth.3037
- Midgett, M., Chivukula, V. K., Dorn, C., Wallace, S., & Rugonyi, S. (2015). Blood flow through the embryonic heart outflow tract during cardiac looping in HH13-HH18 chicken embryos. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(111): 2015062. doi: 10.1098/rsif.2015.0652
- Midgett, M., Goenezen, S., & Rugonyi, S. (2014). Blood flow dynamics reflect degree of outflow tract banding in Hamburger-Hamilton stage 18 chicken embryos. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(100): 20140643. doi: 10.1098/rsif.2014.0643
- Midgett, M., Lopez, C. S., David, L., Maloyan, A., & Rugonyi, S. (2017a). Increased Hemodynamic Load in Early Embryonic Stages Alters Endocardial to Mesenchymal Transition. *Frontiers in Physiology*, 8: 56. doi: 10.3389/fphys.2017.00056
- Midgett, M., Thornburg, K., & Rugonyi, S. (2017b). Blood flow patterns underlie developmental heart defects. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 312(3), H632-H642. doi: 10.1152/ajpheart.00641.2016
- Mikawa, T., Borisov, A., Brown, A. M. C., & Fischman, D. A. (1992). Clonal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication-defective retrovirus. 1. Formation of the ventricular myocardium [Article]. *Developmental Dynamics*, 193(1), 11-23.
- Mikawa, T., & Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Developmental Biology*, 174(2), 221-232. doi: 10.1006/dbio.1996.0068
- Mikawa, T., & Hurtado, R. (2007). Development of the cardiac conduction system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(1), 90-100. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.12.008
- Milgrom-Hoffman, M., Harrelson, Z., Ferrara, N., Zelzer, E., Evans, S. M., & Tzahor, E. (2011). The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors. *Development*, 138(21), 4777-4787. doi: 10.1242/dev.061192
- Miquerol, L., Bellon, A., Moreno, N., Beyer, S., Meilhac, S. M., Buckingham, M., Franco, D., Kelly, R. G. (2013). Resolving cell lineage contributions to the ventricular conduction system with a Cx40-GFP allele: A dual contribution of the first and second heart fields. *Developmental Dynamics*, 242(6), 665-677. doi: 10.1002/dvdy.23964
- Miquerol, L., Beyer, S., & Kelly, R. G. (2011). Establishment of the mouse ventricular conduction system. [Review]. *Cardiovascular Research*, 91(2), 232-242. doi:

10.1093/cvr/cvr069

- Miquerol, L., Dupays, L., Theveniau-Ruissy, M., Alcolea, S., Jarry-Guichard, T., Abran, P., & Gros, D. (2003). Gap junctional connexins in the developing mouse cardiac conduction system. *Novartis Foundation symposium*, 250, 80-109.
- Miquerol, L., & Kelly, R. G. (2009). Monitoring Clonal Growth in the Developing Ventricle. [Proceedings Paper]. *Pediatric Cardiology*, 30(5), 603-608. doi: 10.1007/s00246-008-9371-4
- Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H. V. M., Abran, P., Jongsma, H., Nargeot, J.L., Gros, D. (2004). Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovascular Research*, 63(1), 77-86. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.007
- Miquerol, L., Moreno-Rascon, N., Beyer, S., Dupays, L., Meilhac, S. M., Buckingham, M. E., Franco, D., Kelly, R. G. (2010). Biphasic Development of the Mammalian Ventricular Conduction System. [Article]. *Circulation Research*, 107(1), 153-161. doi: 10.1161/circresaha.110.218156
- Miragoli, M., Gaudesius, G., & Rohr, S. (2006). Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circulation Research*, 98(6), 801-810. doi: 10.1161/01.RES.0000214537.44195.a3
- Misfeldt, A. M., Boyle, S. C., Tompkins, K. L., Bautch, V. L., Labosky, P. A., & Baldwin, H. S. (2009). Endocardial cells are a distinct endothelial lineage derived from Flk1+ multipotent cardiovascular progenitors. [Article]. *Developmental Biology*, 333(1), 78-89. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.06.033
- Misra, C., Chang, S. W., Basu, M., Huang, N. Y., & Garg, V. (2014). Disruption of myocardial Gata4 and Tbx5 results in defects in cardiomyocyte proliferation and atrioventricular septation. *Human Molecular Genetics*, 23(19), 5025-5035. doi: 10.1093/hmg/ddu215
- Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hebert, J. M., Rigby, P. W. J., & Tjian, R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes & Development*, 5(1), 105-119. doi: 10.1101/gad.5.1.105
- Mitsuiye, T., Guo, J. Q., & Noma, A. (1999). Nicardipine-sensitive Na<sup>+</sup>-mediated single channel currents in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells. *Journal of Physiology-London*, 521(1), 69-79. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.00069.x
- Mittal, A., Pulina, M., Hou, S. Y., & Astrof, S. (2013). Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis. *Developmental Biology*, 381(1), 73-82. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.06.010
- Mjaatvedt, C. H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R. A., Kern, M. J., Eisenberg, C. A., Turner, D., Markwald, R. R. (2001). The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. [Article]. *Developmental Biology*, 238(1), 97-109. doi: 10.1006/dbio.2001.0409
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & Grp, P. (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *Journal of Clinical Epidemiology*, 62(10), 1006-1012. doi: 10.1016/j.jclinepi.2009.06.005
- Molin, D. G. M., Bartram, U., Van der Heiden, K., Van Iperen, L., Speer, C. P., Hierck, B. P., Poelmann, R.E., Gittenberger-de-Groot, A. C. (2003). Expression patterns of Tgfβ1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton. *Developmental Dynamics*, 227(3), 431-444. doi: 10.1002/dvdy.10314
- Molinaro, K., Chu-LaGriff, Q., & Ramasubramanian, A. (2013). Role of the heart beat during early s-looping of the early embryonic vertebrate heart. [Meeting Abstract]. *Faseb Journal*, 27: 527.3.
- Molkentin, J. D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4,-5, and-6 - Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. [Review].

- Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 38949-38952.
- Molkentin, J. D., Antos, C., Mercer, B., Taigen, T., Miano, J. M., & Olson, E. N. (2000). Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: Evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart. [Article]. *Developmental Biology*, 217(2), 301-309.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., & Olson, E. N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*, 83(7), 1125-1136. doi: 10.1016/0092-8674(95)90139-6
- Molkentin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A., & Olson, E. N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. [Article]. *Genes & Development*, 11(8), 1061-1072.
- Mommersteeg, M. T. M., Brown, N. A., Prall, O. W. J., Vries, C., Harvey, R. P., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2007a). Pitx2c and nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circulation Research*, 101(9), 902-909. doi: 10.1161/circresaha.107.161182
- Mommersteeg, M. T. M., Dominguez, J. N., Wiese, C., Norden, J., de Gier-de Vries, C., Burch, J. B. E., Kispert, A., Brown, N.A., Moorman, A.F.M., Christoffels, V. M. (2010). The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development. [Article]. *Cardiovascular Research*, 87(1), 92-101. doi: 10.1093/cvr/cvq033
- Mommersteeg, M. T. M., Hoogaars, W. M. H., Prall, O. W. J., de Gier-de Vries, C., Wiese, C., Clout, D. E. W., Papaioannou, V.E., Brown, N.A., Harvey, R.P., Moorman, A.F.M., Christoffels, V. M. (2007b). Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circulation Research*, 100(3), 354-362. doi: 10.1161/01.RES.0000258019.74591.b3
- Mommersteeg, M. T. M., Soufan, A. T., de Lange, F. J., van den Hoff, M. J. B., Anderson, R. H., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. M. (2006). Two distinct pools of mesenchyme contribute to the development of the atrial septum. [Editorial Material]. *Circulation Research*, 99(4), 351-353. doi: 10.1161/01.RES.0000238360.33284.a0
- Mönckeberg, J. (1910). Beitrag zur normalen und pathologischen Anatomie des Herzens *Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 14, 64-71.
- Monsoro-Burq, A. H., & Le Douarin, N. M. (2001). BMP4 plays a key role in left-right patterning in chick embryos by maintaining sonic hedgehog asymmetry. [Article]. *Molecular Cell*, 7(4), 789-799.
- Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D., & Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*, 126(9), 1845-1857.
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W., & Anderson, R. H. (2003). Development of the heart: (1) Formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*, 89(7), 806-814. doi: 10.1136/heart.89.7.806
- Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2003). Cardiac chamber formation: Development, genes, and evolution. [Review]. *Physiological Reviews*, 83(4), 1223-1267. doi: 10.1152/physrev.00006.2003
- Moorman, A. F. M., Christoffels, V. M., Anderson, R. H., & van den Hoff, M. J. B. (2007). The heart-forming fields: one or multiple? [Article]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 362(1484), 1257-1265. doi: 10.1098/rstb.2007.2113
- Moorman, A. F. M., de Jong, F., Denyn, M., & Lamers, W. H. (1998). Development of the cardiac conduction system. *Circulation Research*, 82(6), 629-644.
- Moorman, A. F. M., Schumacher, C. A., de Boer, P. A. J., Hagoort, J., Bezstarosti, K., van den Hoff, M. J. B., Wagenaar, G.T.M., Lamers, J.M.J., Wuytack, F., Christoffels, V.M., Fiolet, J. W. T. (2000). Presence of functional sarcoplasmic reticulum in the

- developing heart and its confinement to chamber myocardium. *Developmental Biology*, 223(2), 279-290. doi: 10.1006/dbio.2000.9752
- Morabito, C. J., Dettman, R. W., Kattan, J., Collier, J. M., & Bristow, J. (2001). Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Developmental Biology*, 234(1), 204-215. doi: 10.1006/dbio.2001.0254
- Moreno-Rodriguez, R. A., Krug, E. L., Reyes, L., Villavicencio, L., Mjaatvedt, C. H., & Markwald, R. R. (2006). Bidirectional fusion of the heart-forming fields in the developing chick embryo. [Article]. *Developmental Dynamics*, 235(1), 191-202. doi: 10.1002/dvdy.20601
- Moretti, A., Bellin, M., Jung, C. B., Thies, T. M., Takashima, Y., Bernshausen, A., Schiemann, M., Fischer, S., Moosmang, S., Smith, A.G., Lam, J.T., Laugwitz, K. L. (2010). Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1(+) cardiovascular progenitors. *Faseb Journal*, 24(3), 700-711. doi: 10.1096/fj.09-139477
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J. T., Bernshausen, A., Chen, Y. H., Qyang, Y. B., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., Sun, Y. F., Evans, S. M., Laugwitz, K. L., Chien, K. R. (2006). Multipotent embryonic Isl1(+) progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*, 127(6), 1151-1165. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.029
- Mori, A. D., Zhu, Y. H., Vahora, I., Nieman, B., Koshiba-Takeuchi, K., Davidson, L., Pizard, A., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Chen, X. J., Henkelman, R. M., Bruneau, B. G. (2006). Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Developmental Biology*, 297(2), 566-586. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.023
- Mori, S., Fukuzawa, K., Takaya, T., Takamine, S., Ito, T., Fujiwara, S., Nishii, T., Kono, A.K., Yoshida, A., Hirata, K.-I., Hirata, K. I. (2016). Clinical cardiac structural anatomy reconstructed within the cardiac contour using multidetector-row computed tomography: Atrial septum and ventricular septum. *Clinical Anatomy*, 29(3), 342-352.
- Moskowitz, I. P., Wang, J., Peterson, M. A., Pu, W. T., Mackinnon, A. C., Oxburgh, L., Chu, G. C., Sarkar, M., Berul, C., Smoot, L., Robertson, E. J., Schwartz, R., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (2011). Cardiac-specific transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4006-4011. doi: 10.1073/pnas.1019025108
- Moskowitz, I. P. G., Kim, J. B., Moore, M. L., Wolf, C. M., Peterson, M. A., Shendure, J., Nobrega, M. A., Yokota, Y., Berul, C., Izumo, S., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (2007). A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell*, 129(7), 1365-1376. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.036
- Moskowitz, I. P. G., Pizard, A., Patel, V. V., Bruneau, B. G., Kim, J. B., Kupersmidt, S., Roden, D., Berul, C.I., Seidmann, C.E., Seidman, J. G. (2004). The T-box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development*, 131(16), 4107-4116. doi: 10.1242/dev.01265
- Munoz-Chapuli, R., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Perez-Pomares, J. M., Macias, D., Atencia, G., & Aranda, M. J. (2001). Origin of endothelial cells from mesothelial-derived mesenchymal cells in the liver of avian embryos. *International Journal of Developmental Biology*, 45, S143-S144.
- Munoz-Chapuli, R., Carmona, R., Guadix, J. A., Macias, D., & Perez-Pomares, J. M. (2005). The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evolution & Development*, 7(4), 351-358. doi: 10.1111/j.1525-142X.2005.05040.x

- Munoz-Chapuli, R., Perez-Pomares, J. M., Macias, D., Garcia-Garrido, L., Carmona, R., & Gonzalez, M. (1999). Differentiation of hemangioblasts from embryonic mesothelial cells? A model on the origin of the vertebrate cardiovascular system. *Differentiation*, *64*(3), 133-141. doi: 10.1046/j.1432-0436.1999.6430133.x
- Munshi, N. V., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Berry, J. M., Richardson, J. A., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2009). Cx30.2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development*, *136*(15), 2665-2674. doi: 10.1242/dev.038562
- Murray, S. A., & Gridley, T. (2006). Snail1 gene function during early embryo patterning in mice. *Cell Cycle*, *5*(22), 2566-2570. doi: 10.4161/cc.5.22.3502
- Murry, C. E., & Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: Lessons from embryonic development. *Cell*, *132*(4), 661-680. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.008
- Nadeau, M., Georges, R. O., Laforest, B., Yamak, A., Lefebvre, C., Beaugregard, J., Paradis, P., Bruneau, B.G., Andelfinger, G., Nemer, M. (2010). An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(45), 19356-19361. doi: 10.1073/pnas.0914888107
- Nahirney, P. C., Mikawa, T., & Fischman, D. A. (2003). Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. [Article]. *Developmental Dynamics*, *227*(4), 511-523. doi: 10.1002/dvdy.10335
- Naito, A. T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., & Komuro, I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(52), 19812-19817. doi: 10.1073/pnas.0605768103
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Ando, K., & Nakamura, H. (2002). Significance of bone morphogenetic protein-4 function in the initial myofibrillogenesis of chick cardiogenesis. [Article]. *Developmental Biology*, *245*(2), 291-303. doi: 10.1006/dbio.2002.0637
- Nakamura, T., Colbert, M. C., & Robbins, J. (2006a). Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. [Article]. *Circulation Research*, *98*(12), 1547-1554. doi: 10.1161/01.res.0000227505.19472.69
- Nakamura, T., & Hamada, H. (2012). Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms. *Development*, *139*(18), 3257-3262. doi: 10.1242/dev.061606
- Nakamura, T., Mine, N., Nakaguchi, E., Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C., Hamada, H. (2006b). Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system. *Developmental Cell*, *11*(4), 495-504. doi: 10.1016/j.devcel.2006.08.002
- Nakamura, T., Saito, D., Kawasumi, A., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Dong, F.L., Takamatsu, A., Belo, J.A., Mochizuki, A., Hamada, H. (2012). Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of Cerl2 mRNA. *Nature Communications*, *3*: 1322. doi: 10.1038/ncomms2319
- Nakano, A., Nakano, H., Smith, K. A., & Palpant, N. J. (2016). The developmental origins and lineage contributions of endocardial endothelium. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, *1863*(7), 1937-1947. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.022
- Nakano, H., Liu, X. Q., Arshi, A., Nakashima, Y., van Handel, B., Sasidharan, R., Harmon, A. W., Shin, J. H., Schwartz, R. J., Conway, S. J., Harvey, R. P., Pashmforoush, M., Mikkola, H. K. A., Nakano, A. (2013). Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis. *Nature Communications* *2013*, *4*: 1564. doi: 10.1038/ncomms2569
- Nakaya, M. A., Biris, K., Tsukiyama, T., Jaime, S., Rawls, J. A., & Yamaguchi, T. P. (2005).

- Wnt3a links left-right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation. *Development*, 132(24), 5425-5436. doi: 10.1242/dev.02149
- Neill, C. A. (1956). Development of the pulmonary veins - with reference to the embryology of anomalies of pulmonary venous return. *Pediatrics*, 18(6), 880-887.
- Nelson, D. O., Jin, D. X., Downs, K. M., Kamp, T. J., & Lyons, G. E. (2014). Irx4 Identifies a Chamber-Specific Cell Population That Contributes to Ventricular Myocardium Development. *Developmental Dynamics*, 243(3), 381-392. doi: 10.1002/dvdy.24078
- Nelson, D. O., Lalit, P. A., Biermann, M., Markandeya, Y. S., Capes, D. L., Adesso, L., Patel, G., Han, T. X., John, M. C., Powers, P. A., Downs, K. M., Kamp, T. J., Lyons, G. E. (2016). Irx4 Marks a Multipotent, Ventricular-Specific Progenitor Cell. *Stem Cells*, 34(12), 2875-2888. doi: 10.1002/stem.2486
- Nelson, T. J., Ge, Z. D., Van Orman, J., Barron, M., Rudy-Reil, D., Hacker, T. A., Misra, R., Duncan, S.A., Auchampach, J.A., Lough, J. W. (2006). Improved cardiac function in infarcted mice after treatment with pluripotent embryonic stem cells. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 288A(11), 1216-1224. doi: 10.1002/ar.a.20388
- Nemer, G., & Nemer, M. (2002). Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development*, 129(17), 4045-4055.
- Nemer, G., & Nemer, M. (2003). Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and-6. *Developmental Biology*, 254(1), 131-148. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00026-0
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews*, 85(4), 1205-1253. doi: 10.1152/physrev.00002.2005
- Nerurkar, N. L., Ramasubramanian, A., & Taber, L. A. (2006). Morphogenetic adaptation of the looping embryonic heart to altered mechanical loads. [Article]. *Developmental Dynamics*, 235(7), 1822-1829. doi: 10.1002/dvdy.20813
- Nesbitt, T., Lemley, A., Davis, J., Yost, M. J., Goodwin, R. L., & Potts, J. D. (2006). Epicardial development in the rat: A new perspective. *Microscopy and Microanalysis*, 12(5), 390-398. doi: 10.1017/s1431927606060533
- Nesbitt, T. L., Roberts, A., Tan, H., Junor, L., Yost, M. J., Potts, J. D., Dettmann, R.W., Goodwin, R. L. (2009). Coronary Endothelial Proliferation and Morphogenesis Are Regulated by a VEGF-Mediated Pathway. *Developmental Dynamics*, 238(2), 423-430. doi: 10.1002/dvdy.21847
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P., & Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics*, 21(4), 444-448. doi: 10.1038/7788
- Niederreither, K., Vermot, J., Fraulob, V., Chambon, P., & Dolle, P. (2002). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16111-16116. doi: 10.1073/pnas.252626599
- Niederreither, K., Vermot, J., Messaddeq, N., Schuhbaur, B., Chambon, P., & Dolle, P. (2001). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*, 128(7), 1019-1031.
- Nijmeijer, R. M., Leeuwis, J. W., DeLisio, A., Mummery, C. L., & Lopes, S. (2009). Visceral endoderm induces specification of cardiomyocytes in mice. [Article]. *Stem Cell Research*, 3(2-3), 170-178. doi: 10.1016/j.scr.2009.06.003
- Nishii, K., & Shibata, Y. (2006). Mode and determination of the initial contraction stage in the mouse embryo heart. *Anatomy and Embryology*, 211(2), 95-100. doi: 10.1007/s00429-005-0065-x
- Niu, Z., Li, A. K., Zhang, S. X., & Schwartz, R. J. (2007). Serum response factor micromanaging cardiogenesis. [Article]. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(6), 618-

627. doi: 10.1016/j.ceb.2007.09.013
- Noden, D. M., Poelmann, R. E., & Groot, A. C. G. (1995). Cell origins and tissue boundaries during outflow tract development. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 5(2), 69-75. doi: 10.1016/s1050-1738(99)80002-4
- Noma, A., & Irisawa, H. (1975). Contribution of an electrogenic sodium pump to the membrane potential in rabbit sinoatrial node cells. *Pflügers Archiv*, 358(4), 289-301.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., & Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. [Article]. *Nature*, 418(6893), 96-99. doi: 10.1038/nature00849
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 95(6), 829-837. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81705-5
- Nonaka, S., Yoshihara, S., Watanabe, D., Ikeuchi, S., Goto, T., Marshall, W. F., & Hamada, H. (2005). De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *Plos Biology*, 3(8), 1467-1472. doi: 10.1371/journal.pbio.0030268
- Norden, J., Grieskamp, T., Lausch, E., van Wijk, B., van den Hoff, M. J. B., Englert, C., . . . Kispert, A. (2010). Wt1 and Retinoic Acid Signaling in the Subcoelomic Mesenchyme Control the Development of the Pleuropericardial Membranes and the Sinus Horns. *Circulation Research*, 106(7), 1212-1220. doi: 10.1161/circresaha.110.217455
- Normand, J., Bozio, A., Andre, M., Sassolas, F., & Lagnier, M. (1991). Cardiac anomalies in Di-George Syndrome *Pediatrics*, 46(3), 287-291.
- Norris, D. P., Brennan, J., Bikoff, E. K., & Robertson, E. J. (2002). The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development*, 129(14), 3455-3468.
- Norris, R. A., Damon, B., Mironov, V., Kasyanov, V., Ramamurthi, A., Moreno-Rodriguez, R., Trusk, T., Potts, J. D., Goodwin, R. L., Davis, J., Hoffman, S., Wen, X., Sugi, Y., Kern, C. B., Mjaatvedt, C. H., Turner, D. K., Oka, T., Conway, S. J., Molkentin, J. D., Forgacs, G., Markwald, R. R. (2007). Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. [Article]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(3), 695-711. doi: 10.1002/jcb.21224
- Norris, R. A., Kern, C. B., Wessels, A., Wirrig, E. E., Markwald, R. R., & Mjaatvedt, C. H. (2005). Detection of beta ig-H3, a TGF beta induced gene, during cardiac development and its complementary pattern with periostin. [Article]. *Anatomy and Embryology*, 210(1), 13-23. doi: 10.1007/s00429-005-0010-z
- Norris, R. A., Moreno-Rodriguez, R. A., Sugi, Y., Hoffman, S., Amos, J., Hart, M. M., Potts, J.D., Goodwin, R.L., Markwald, R. R. (2008). Periostin regulates atrioventricular valve maturation. *Developmental Biology*, 316(2), 200-213. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.003
- Norris, R. A., Potts, J. D., Yost, M. J., Junor, L., Brooks, T., Tan, H., Hoffman, S., Hart, M. M., Kern, M. J., Damon, B., Markwald, R. R., Goodwin, R. L. (2009). Periostin Promotes a Fibroblastic Lineage Pathway in Atrioventricular Valve Progenitor Cells. [Article]. *Developmental Dynamics*, 238(5), 1052-1063. doi: 10.1002/dvdy.21933
- North, T. E., Goessling, W., Peeters, M., Li, P., Ceol, C., Lord, A. M., . Weber, G.J., Harris, J., Cutting, C.C., Huang, P., Dzierzak, E., Zon, L. I. (2009). Hematopoietic Stem Cell Development Is Dependent on Blood Flow. *Cell*, 137(4), 736-748. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.023>
- Novodvorsky, P., & Chico, T. J. A. (2014). The Role of the Transcription Factor KLF2 in Vascular Development and Disease. In T. J. A. Chico (Ed.), *Genetics of Cardiovascular Disease*, Verlag Elsevier, New York, Vol. 124, pp. 155-188.
- Nowotschin, S., Liao, J., Gage, P. J., Epstein, J. A., Campione, M., & Morrow, B. E. (2006). Tbx1 affects asymmetric cardiac morphogenesis by regulating Pitx2 in the secondary

- heart field. [Article]. *Development*, 133(8), 1565-1573. doi: 10.1242/dev.02309
- Ocana, O. H., Coskun, H., Minguillon, C., Murawala, P., Tanaka, E. M., Galceran, J., Munoz-Chapuli, R., Nieto, M. A. (2017). A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature*, 549(7670), 86-90. doi: 10.1038/nature23454
- O'Farrell, P.H., Stumpff, J., Su, T.T. (2004). Embryonic cleavage cycles: How is a mouse like a fly?. *Current Biology*, 14, R35-R45
- Ohad, D.G., Avrahami, A., Waner, T., David, L. (2013). The occurrence and suspected mode of inheritance of congenital subaortic stenosis and tricuspid valve dysplasia in Dogue de Bordeaux dogs. *Veterinary Journal*, 197(2), 351-357
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J. C. I., & Hirokawa, N. (2005). Mechanism of nodal flow: A conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell*, 121(4), 633-644. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.008
- Okagawa, H., Markwald, R. R., & Sugi, Y. (2007). Functional BMP receptor in endocardial cells is required in atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in chick. [Article]. *Developmental Biology*, 306(1), 179-192. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.015
- Okamoto, N., Akimoto, N., Hidaka, N., Shoji, S., & Sumida, H. (2010). Formal genesis of the outflow tracts of the heart revisited: Previous works in the light of recent observations. *Congenital Anomalies*, 50(3), 141-158. doi: 10.1111/j.1741-4520.2010.00286.x
- Okamoto, N., Satow, Y., Hidaka, N., Akimoto, N., & Miyabara, S. (1978). Morphogenesis of congenital heart anomaly – bulboventricular malformations. [Article]. *Japanese Circulation Journal-English Edition*, 42(10), 1105-1120.
- Oki, S., Hashimoto, R., Okui, Y., Shen, M. M., Mekada, E., Otani, H., Saijoh, Y., Hamada, H. (2007). Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. *Development*, 134(21), 3893-3904. doi: 10.1242/dev.009464
- Olaopa, M., Zhou, H. M., Snider, P., Wang, J., Schwartz, R. J., Moon, A. M., & Conway, S. J. (2011). Pax3 is essential for normal cardiac neural crest morphogenesis but is not required during migration nor outflow tract septation. *Developmental Biology*, 356(2), 308-322. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.583
- Olbrich, H., Haffner, K., Andreas, K., Volkel, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., Zariwala, M., Noone, P. G., Knowles, M., Mitchison, H. M., Meeks, M., Chung, E. M. K., Hildebrandt, F., Sudbrak, R., Omran, H. (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *European Journal of Human Genetics*, 10, 71-71.
- Olivey, H. E., Mundell, N. A., Austin, A. F., & Barnett, J. V. (2006). Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Developmental Dynamics*, 235(1), 50-59. doi: 10.1002/dvdy.20593
- Olivey, H. E., & Svensson, E. C. (2010). Epicardial-Myocardial Signaling Directing Coronary Vasculogenesis. *Circulation Research*, 106(5), 818-832. doi: 10.1161/circresaha.109.209197
- Olson, E. N. (2006). Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. *Science*, 313(5795), 1922-1927. doi: 10.1126/science.1132292
- Olson, E. N., & Srivastava, D. (1996). Molecular pathways controlling heart development. *Science*, 272(5262), 671-676. doi: 10.1126/science.272.5262.671
- Ono, K., & Ito, H. (1995). Role of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current in sinoatrial node pacemaker activity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 269(2), H453-H462.
- Ono, K., Shibata, S., & Iijima, T. (2000). Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *Journal of Physiology-London*, 524(1), 51-62. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00051.x
- Oosthoek, P. W., Wenink, A. C. G., Vrolijk, B. C. M., Wisse, L. J., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., & Gittenberger-de Groot, A. C. (1998). Development of the

- atrioventricular valve tension apparatus in the human heart. [Article]. *Anatomy and Embryology*, 198(4), 317-329. doi: 10.1007/s004290050187
- Osmond, M. K., Butler, A. J., Voon, F. C. T., & Bellairs, R. (1991). THE EFFECTS OF RETINOIC ACID ON HEART FORMATION IN THE EARLY CHICK-EMBRYO. *Development*, 113(4), 1405-1417.
- Otto, A., Pieper, T., Viebahn, C., & Tsikolia, N. (2014). Early Left-Right Asymmetries During Axial Morphogenesis in the Chick Embryo. *Genesis*, 52(6), 614-625. doi: 10.1002/dvg.22773
- Pae, S. H., Dokic, D., & Dettman, R. W. (2008). Communication between integrin receptors facilitates epicardial cell adhesion and matrix organization. [Article]. *Developmental Dynamics*, 237(4), 962-978. doi: 10.1002/dvdy.21488
- Paff, G. H., Boucek, R. J., & Harrell, T. C. (1968). Observations on development of electrocardiogram. *Anatomical Record*, 160(3), 575-581. doi: 10.1002/ar.1091600306
- Palencia-Desai, S., Kohli, V., Kang, J., Chi, N. C., Black, B. L., & Sumanas, S. (2011). Vascular endothelial and endocardial progenitors differentiate as cardiomyocytes in the absence of Etsrp/Etv2 function. *Development*, 138(21), 4721-4732. doi: 10.1242/dev.064998
- Palencia-Desai, S., Rost, M. S., Schumacher, J. A., Ton, Q. V., Craig, M. P., Baltrunaite, K., Koenig, A.L., Wang, J.H., Poss, K.D., Chi, N.C., Stainier, D.Y.R., Sumanas, S. (2015). Myocardium and BMP signaling are required for endocardial differentiation. *Development*, 142(13), 2304-2315. doi: 10.1242/dev.118687
- Panzer, A. A., Regmi, S. D., Cormier, D., Danzo, M. T., Chen, I. B. D., Winston, J. B., Hutchinson, A.K., Salm, D., Schulkey, C.E., Cochran, R.S., Wilson, D.B., Jay, P. Y. (2017). Nkx2-5 and Sarcospan genetically interact in the development of the muscular ventricular septum of the heart. *Scientific Reports*, 7: 46438. doi: 10.1038/srep46438
- Parameswaran, M., & Tam, P. P. L. (1995). Regionalization of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Developmental Genetics*, 17(1), 16-28. doi: 10.1002/dvg.1020170104
- Pardanaud, L., Moyon, D., & Eichmann, A. (2001). Endothelial ontogeny. *M S-Medecine/Sciences*, 17(5), 543-551.
- Park, D. S., Tompkins, R. O., Liu, F., Zhang, J., Phoon, C. K. L., Zavadil, J., & Fishman, G. I. (2013). Pocket proteins critically regulate cell cycle exit of the trabecular myocardium and the ventricular conduction system. *Biology open*, 2(9), 968-978. doi: 10.1242/bio.20135785
- Park, E. J., Ogden, L. A., Talbot, A., Evans, S., Cai, C. L., Black, B. L., Frank, D.U., Moon, A. M. (2006). Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling. [Article]. *Development*, 133(12), 2419-2433. doi: 10.1242/dev.02367
- Park, E. J., Watanabe, Y., Smyth, G., Miyagawa-Tomita, S., Meyers, E., Klingensmith, J., Camenisch, T., Buckingham, M., Moon, A. M. (2008). An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. [Article]. *Development*, 135(21), 3599-3610. doi: 10.1242/dev.025437
- Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology*, 50(1-2), 1-15. doi: 10.1023/a:1006493130855
- Patel, K., Isaac, A., & Cooke, J. (1999). Nodal signalling and the roles of the transcription factors SnR and Pitx2 in vertebrate left-right asymmetry. *Current Biology*, 9(11), 609-612. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80267-x
- Patel, R., & Kos, L. (2005). Endothelin-1 and neuregulin-1 convert embryonic cardiomyocytes into cells of the conduction system in the mouse. *Developmental Dynamics*, 233(1), 20-28. doi: 10.1002/dvdy.20284
- Patten, B. M. (1922). The formation of the cardiac loop in the chick. *American Journal of Anatomy* (30), 373- 397.

- Patten, B. M. (1949). Initiation and early changes in the character of the heart beat in vertebrate embryos. *Physiological Reviews*, 29(1), 31-47.
- Patten, B. M., & Kramer, T. C. (1948). Valvular action by localized masses of endocardial cushion tissue in the embryonic chick heart. [Meeting Abstract]. *Anatomical Record*, 100(4), 702-703.
- Patthey, C., Edlund, T., & Gunhaga, L. (2009). Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate. *Development*, 136(1), 73-83. doi: 10.1242/dev.025890
- Pauza, D. H., Saburkina, I., Rysevaite, K., Inokaitis, H., Jokubauskas, M., Jalife, J., & Pauziene, N. (2013). Neuroanatomy of the murine cardiac conduction system A combined stereomicroscopic and fluorescence immunohistochemical study. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*, 176(1-2), 32-47. doi: 10.1016/j.autneu.2013.01.006
- Peacock, J. D., Lu, Y., Koch, M., Kadler, K. E., & Lincoln, J. (2008). Temporal and spatial expression of collagens during murine atrioventricular heart valve development and maintenance. *Developmental Dynamics*, 237(10), 3051-3058. doi: 10.1002/dvdy.21719
- Peng, T., Tian, Y., Boogerd, C. J., Lu, M. M., Kadzik, R. S., Stewart, K. M., Evans, S.M., Morrisey, E. E. (2013). Coordination of heart and lung co-development by a multipotent cardiopulmonary progenitor. *Nature*, 500(7464), 589-592. doi: 10.1038/nature12358
- Peng, Y., Song, L., Li, D., Kesterson, R., Wang, J., Wang, L., Rokosh, G., Wu, B., Wang, Q., Jiao, K. (2016). Sema6D acts downstream of bone morphogenetic protein signalling to promote atrioventricular cushion development in mice. *Cardiovascular Research*, 112(2), 532-542. doi: 10.1093/cvr/cvw200
- Pennisi, D. J., Ballard, V. L. T., & Mikawa, T. (2003). Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart. *Developmental Dynamics*, 228(2), 161-172. doi: 10.1002/dvdy.10360
- Pennisi, D. J., & Mikawa, T. (2005). Normal patterning of the coronary capillary plexus is dependent on the correct transmural gradient of FGF expression in the myocardium. *Developmental Biology*, 279(2), 378-390. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.12.028
- Pennisi, D. J., & Mikawa, T. (2009). FGFR-1 is required by epicardium-derived cells for myocardial invasion and correct coronary vascular lineage differentiation. *Developmental Biology*, 328(1), 148-159. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.023
- Pennisi, D. J., Rentschler, S., Gourdie, R. G., Fishman, G. I., & Mikawa, T. (2002). Induction and patterning of the cardiac conduction system. *International Journal of Developmental Biology*, 46(6), 765-775.
- Peralta, M., Steed, E., Harlepp, S., Gonzalez-Rosa, J. M., Monduc, F., Ariza-Cosano, A., Cortes, A., Rayon, T., Gomez-Skormeta, J.L., Zapata, A., Vermot, J., Mercader, N. (2013). Heartbeat-Driven Pericardiac Fluid Forces Contribute to Epicardium Morphogenesis. *Current Biology*, 23(18), 1726-1735. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.005
- Perez-Lugones, A., McMahan, J. T., Ratliff, N. B., Saliba, W. I., Schweikert, R. A., Marrouche, N. F., Saad, E.B., Navia, J.L., McCarthy, P.M., Tchou, B., Gillinov, A.M., Natale, A. (2003). Evidence of specialized conduction cells in human pulmonary veins of patients with atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 14(8), 803-809. doi: 10.1046/j.1540-8167.2003.03075.x
- Perez-Pomares, J. M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., & Munoz-Chapuli, R. (2002a). Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *International Journal of Developmental Biology*, 46(8), 1005-1013.

- Perez-Pomares, J. M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Macias, D., Guadix, J. A., & Munoz-Chapuli, R. (2004). Contribution of mesothelium-derived cells to liver sinusoids in avian embryos. *Developmental Dynamics*, 229(3), 465-474. doi: 10.1002/dvdy.10455
- Perez-Pomares, J. M., Macias, D., Garcia-Garrido, L., & Munoz-Chapuli, R. (1997). Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Developmental Dynamics*, 210(2), 96-105. doi: 10.1002/(sici)1097-0177(199710)210:2<96::aid-aja3>3.0.co;2-4
- Perez-Pomares, J. M., Phelps, A., Sedmerova, M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Munoz-Chapuli, R., & Wessels, A. (2002b). Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: A model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). [Article]. *Developmental Biology*, 247(2), 307-326. doi: 10.1006/dbio.2002.0706
- Perez-Pomares, J. M., Phelps, A., Sedmerova, M., & Wessels, A. (2003). Epicardial-like cells on the distal arterial end of the cardiac outflow tract do not derive from the proepicardium but are derivatives of the cephalic pericardium. *Developmental Dynamics*, 227(1), 56-68. doi: 10.1002/dvdy.10284
- Perles, Z., Moon, S., Ta-Shma, A., Yaacov, B., Francescatto, L., Edvardson, S., Rein, A., Elpeleg, O., Katsanis, N. (2015). A human laterality disorder caused by a homozygous deleterious mutation in MMP21. *Journal of Medical Genetics*, 52(12), 840-847. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103336
- Pestel, J., Ramadass, R., Gauvrit, S., Helker, C., Herzog, W., & Stainier, D. Y. R. (2016). Real-time 3D visualization of cellular rearrangements during cardiac valve formation. *Development*, 143(12), 2217-2227. doi: 10.1242/dev.133272
- Phillips, H. M., Mahendran, P., Singh, E., Anderson, R. H., Chaudhry, B., & Henderson, D. J. (2013). Neural crest cells are required for correct positioning of the developing outflow cushions and pattern the arterial valve leaflets. *Cardiovascular Research*, 99(3), 452-460. doi: 10.1093/cvr/cvt132
- Phillips, H. M., Murdoch, J. N., Chaudhry, B., Copp, A. J., & Henderson, D. J. (2005). Vangl2 acts via RhoA signaling to regulate polarized cell movements during development of the proximal outflow tract. *Circulation Research*, 96(3), 292-299. doi: 10.1161/01.res.0000154912.08695.88
- Piedra, M. E., & Ros, M. A. (2002). BMP signaling positively regulates Nodal expression during left-right specification in the chick embryo. [Article]. *Development*, 129(14), 3431-3440.
- Plein, A., Calmont, A., Fantin, A., Denti, L., Anderson, N. A., Scambler, P. J., & Ruhrberg, C. (2015). Neural crest-derived SEMA3C activates endothelial NRP1 for cardiac outflow tract septation. *Journal of Clinical Investigation*, 125(7), 2661-2676. doi: 10.1172/jci79668
- Poelmann, R. E., Gittenberger-De Groot, A. C., Vicente-Steijn, R., Wisse, L. J., Bartelings, M. M., Everts, S., Hoppenbrouwers, T., Kruihof, B. P. T., Jensen, B., de Bruin, P. W., Hirasawa, T., Kuratani, S., Vonk, F., van de Put, J., de Bakker, M. A., Richardson, M. K. (2014). Evolution and Development of Ventricular Septation in the Amniote Heart. *PLoS One*, 9(9): e106569. doi: 10.1371/journal.pone.0106569
- Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M. T., Bokenkamp, R., & Hogers, B. (1993). Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circulation Research*, 73(3), 559-568.
- Pombal, M. A., Carmona, R., Megias, M., Ruiz, A., Perez-Pomares, J. M., & Munoz-Chapuli, R. (2008). Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from an ancestral pronephric external glomerulus.

- [Article]. *Evolution & Development*, 10(2), 210-216. doi: 10.1111/j.1525-142X.2008.00228.x
- Prall, O. W. J., Menon, M. K., Solloway, M. J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., Biben, C., McBride, J. J., Robertson, B. R., Chaulet, H., Stennard, F. A., Wise, N., Schaft, D., Wolstein, O., Furtado, M. B., Shiratori, H., Chien, K. R., Hamada, H., Black, B. L., Saga, Y., Robertson, E. J., Buckingham, M. E. Harvey, R. P. (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. [Article]. *Cell*, 128(5), 947-959. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.042
- Proctor, N. S., & Lynch, P. J. (1993). *Manual of ornithology: avian structure & function*. New Haven, Connecticut, Yale University Press.
- Puskaric, S., Schmitteckert, S., Mori, A. D., Glaser, A., Schneider, K. U., Bruneau, B. G., Blaschke, R.J., Steinbeisser, H., Rappold, G. (2010). Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Human Molecular Genetics*, 19(23), 4625-4633. doi: 10.1093/hmg/ddq393
- Qayyum, S. R., Webb, S., Anderson, R. H., Verbeek, F. J., Brown, N. A., & Richardson, M. K. (2001). Septation and valvar formation in the outflow tract of the embryonic chick heart. [Article]. *Anatomical Record*, 264(3), 273-283. doi: 10.1002/ar.1162
- Qi, Y., Qi, Z. H., Li, Z. C., Wong, C. K., So, C., Lo, I. C., Huang, Y., Yao, X.Q., Tsang, S. Y. (2015). Role of TRPV1 in the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Cardiomyocytes. *PLoS One*, 10(7): e0133211. doi: 10.1371/journal.pone.0133211
- Qiu, D. Y., Cheng, S. M., Wozniak, L., McSweeney, M., Perrone, E., & Levin, M. (2005). Localization and loss-of-function implicates ciliary proteins in early, cytoplasmic roles in left-right asymmetry. *Developmental Dynamics*, 234(1), 176-189. doi: 10.1002/dvdy.20509
- Qiu, Y., Lynch, J., Guo, L., Yatsula, B., Perkins, A. S., & Michalak, M. (2008). Regulation of the calreticulin gene by GATA6 and Evi-1 transcription factors. [Article]. *Biochemistry*, 47(12), 3697-3704. doi: 10.1021/bi702524v
- Qyang, Y., Martin-Puig, S., Chiravuri, M., Chen, S., Xu, H., Bu, L., Jiang, X., Lin, L., Lin, L., Granger, A., Caron, L., Clarke, J., Taketo, M. M., Laugwitz, K. L., Moon, R. T., Gruber, P., Evans, S. M., Ding, S., Chien, K. R. (2007). The renewal and differentiation of Isl1(+) cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. [Article]. *Cell Stem Cell*, 1(2), 165-179. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.018
- Raffin, M., Leong, L. M., Ronces, M. S., Sparrow, D., Mohun, T., & Mercola, M. (2000). Subdivision of the cardiac Nkx2.5 expression domain into myogenic and nonmyogenic compartments. [Article]. *Developmental Biology*, 218(2), 326-340.
- Ramasubramanian, A., Chu-Lagraff, Q. B., Buma, T., Chico, K. T., Carnes, M. E., Burnett, K. R., Bradner, S.A., Gordon, S. S. (2013). On the role of intrinsic and extrinsic forces in early cardiac S-looping. *Developmental Dynamics*, 242(7), 801-816. doi: 10.1002/dvdy.23968
- Ramasubramanian, A., Nerurkar, N. L., Achtien, K. H., Filas, B. A., Voronov, D. A., & Taber, L. A. (2008). On Modeling Morphogenesis of the Looping Heart Following Mechanical Perturbations. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, 130(6): 061018. doi: 10.1115/1.2978990
- Rana, M. S., Horsten, N. C. A., Tesink-Taekema, S., Lamers, W. H., Moorman, A. F. M., & van den Hoff, M. J. B. (2007). Trabeculated right ventricular free wall in the chicken heart forms by ventricularization of the myocardium initially forming the outflow tract. [Article]. *Circulation Research*, 100(7), 1000-1007. doi: 10.1161/01.RES.0000262688.14288.b8
- Rana, M. S., Theveniau-Ruissy, M., De Bono, C., Mesbah, K., Francou, A., Rammah, M., Dominguez, J. N., Roux, M., Laforest, B., Anderson, R. H., Mohun, T., Zaffran, S., Christoffels, V. M., Kelly, R. G. (2014). Tbx1 Coordinates Addition of Posterior

- Second Heart Field Progenitor Cells to the Arterial and Venous Poles of the Heart. *Circulation Research*, 115(9), 790-U118. doi: 10.1161/circresaha.115.305020
- Ranade, S. S., Qiu, Z. Z., Woo, S. H., Hur, S. S., Murthy, S. E., Cahalan, S. M., Xu, J., Mathur, J., Bandell, M., Coste, B., Li, Y. S. J., Chien, S., Patapoutian, A. (2014). Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10347-10352. doi: 10.1073/pnas.1409233111
- Rao, J., Pfeiffer, M. J., Frank, S., Adachi, K., Piccini, I., Quaranta, R., Arauzo-Bravo, M., Schwarz, J., Schade, D., Leidel, S., Scholer, H. R., Seebohm, G., Greber, B. (2016). Stepwise Clearance of Repressive Roadblocks Drives Cardiac Induction in Human ESCs. *Cell Stem Cell*, 18(3), 341-353. doi: 10.1016/j.stem.2015.11.019
- Rao, P. K., Toyama, Y., Chiang, H. R., Gupta, S., Bauer, M., Medvid, R., Reinhardt, F., Liao, R., Krieger, M., Jaenisch, R., Lodish, H. F., Blencowe, R. (2009). Loss of Cardiac microRNA-Mediated Regulation Leads to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. [Article]. *Circulation Research*, 105(6), 585-594. doi: 10.1161/circresaha.109.200451
- Rapila, R., Korhonen, T., & Tavi, P. (2008). Excitation-contraction coupling of the mouse embryonic cardiomyocyte. *Journal of General Physiology*, 132(4), 397-405. doi: 10.1085/jgp.200809960
- Rashidi, H., & Sottile, V. (2009). The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays*, 31(4), 459-465. doi: 10.1002/bies.200800168
- Reamon-Buettner, S. M., Ciribilli, Y., Traverso, I., Kuhls, B., Inga, A., & Borlak, J. (2009). A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart. [Article]. *Human Molecular Genetics*, 18(19), 3567-3578. doi: 10.1093/hmg/ddp305
- Rebagliati, M. R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P., & Dawid, I. B. (1998). Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Developmental Biology*, 199(2), 261-272. doi: 10.1006/dbio.1998.8935
- Reckova, M., Rosengarten, C., deAlmeida, A., Stanley, C. P., Wessels, A., Gourdie, R. G., Thompson, R.P., Sedmera, D. (2003). Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circulation Research*, 93(1), 77-85. doi: 10.1161/01.res.0000079488.91342.b7
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I. L., & Krasnow, M. A. (2010). Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*, 464(7288), 549-553. doi: 10.1038/nature08873
- Redkar, A., Montgomery, M., & Litvin, J. (2001). Fate map of early avian cardiac progenitor cells. [Article]. *Development*, 128(12), 2269-2279.
- Remond, M. C., Fee, J. A., Elson, E. L., & Taber, L. A. (2006). Myosin-based contraction is not necessary for cardiac c-looping in the chick embryo. [Article]. *Anatomy and Embryology*, 211(5), 443-454. doi: 10.1007/s00429-006-0094-0
- Rentschler, S., Harris, B. S., Kuznekoff, L., Jain, R., Manderfield, L., Lu, M. M., Morley, G.E., Patel, V.V., Epstein, J. A. (2011). Notch signaling regulates murine atrioventricular conduction and the formation of accessory pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 525-533. doi: 10.1172/jci44470
- Rentschler, S., Vaidya, D. M., Tamaddon, H., Degenhardt, K., Sassoon, D., Morley, G. E., Jalife, J., Fishman, G. I. (2001). Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development*, 128(10), 1785-1792.
- Rentschler, S., Yen, A. H., Lu, J., Petrenko, N. B., Lu, M. M., Manderfield, L. J., Patel, V.V., Fishman, G.I., Epstein, J. A. (2012). Myocardial Notch Signaling Reprograms Cardiomyocytes to a Conduction-Like Phenotype. *Circulation*, 126(9), 1058-1066. doi: 10.1161/circulationaha.112.103390
- Rentschler, S., Zander, J., Meyers, K., France, D., Levine, R., Porter, G., Rivkees, S.A., Morley, G.E., Fishman, G. I. (2002). Neuregulin-1 promotes formation of the

- murine cardiac conduction system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10464-10469. doi: 10.1073/pnas.162301699
- Richarte, A. M., Mead, H. B., & Tallquist, M. D. (2007). Cooperation between the PDGF receptors in cardiac neural crest cell migration. *Developmental Biology*, 306(2), 785-796. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.04.023
- Risebro, C. A., Smart, N., Dupays, L., Breckenridge, R., Mohun, T. J., & Riley, P. R. (2006). Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart. *Development*, 133(22), 4595-4606. doi: 10.1242/dev.02625
- Rivera-Feliciano, J., Lee, K. H., Kong, S. W., Rajagopal, S., Ma, Q., Springer, Z., Izumo, S., Tabin, C.J., Pu, W. T. (2006a). Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells. [Article]. *Development*, 133(18), 3607-3618. doi: 10.1242/dev.02519
- Rivera-Feliciano, J., & Tabin, C. J. (2006b). Bmp2 instructs cardiac progenitors to form the heart-valve-inducing field. *Developmental Biology*, 295(2), 580-588. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.043>
- Robb, L., Mifsud, L., Hartley, L., Biben, C., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N.A., Harvey, R. P. (1998). epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. *Developmental Dynamics*, 213(1), 105-113. doi: 10.1002/(sici)1097-0177(199809)213:1<105::aid-aja10>3.0.co;2-1
- Robinson, A. (1902). The Early Stages of the Development of the Pericardium. *Journal of Anatomy and Physiology*, 37(Pt1), 1-17.
- Rodgers, L. S., Lalani, S., Runyan, R. B., & Camenisch, T. D. (2008). Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart. *Developmental Dynamics*, 237(1), 145-152. doi: 10.1002/dvdy.21378
- Rodriguez Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A. N., Pascual, J., Ortiz, A., & Izpisua Belmonte, J. C. (1999). The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature*, 401(6750), 243-251.
- Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Kissela, B. M., Kittner, S. J., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Makuc, D. M., Marcus, G. M., Marelli, A., Matchar, D. B., Moy, C. S., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nichol, G., Paynter, N. P., Soliman, E. Z., Sorlie, P. D., Sotoodehnia, N., Turan, T. N., Virani, S. S., Wong, N. D., Woo, D., Turner, M. B. (2012). Heart Disease and Stroke Statistics-2012 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 125(1), E2-E220. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046
- Romer, A. S., Parsons, T. S. (1986). *The vertebrate body* (6 ed.). Cengage Learning, Boston, Massachusetts
- Rosenquist, G. C. (1970). Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: the heart-forming portion of the primitive streak. *Developmental Biology*, 22(3), 461-475.
- Rosenquist, G. C. a. D. H. R. (1966). Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study. *Contributions to Embryology*, 38, 111-121.
- Rosenthal, N., & Harvey, R. P. (2010). *Heart development and regeneration* (Vol. 1): Academic Press, New York
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., & De Luca, L. M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiological Reviews*, 80(3), 1021-1054.
- Roux, M., & Zaffran, S. (2016). Hox Genes in Cardiovascular Development and Diseases. *Journal of Developmental Biology*, 4(2): 14 doi: 10.3390/jdb4020014
- Ruppert, E. E. (2005). Key characters uniting hemichordates and chordates: homologies or homoplasies? *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 83(1), 8-

23. doi: 10.1139/z04-158

- Ruppert, E. E., & Carle, K. J. (1983). Morphology of metazoan circulatory systems. [journal article]. *Zoomorphology*, 103(3), 193-208. doi: 10.1007/bf00310477
- Rüsse, I., & Sinowatz, F. (1998). *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey Buchverlag, Berlin.
- Rüsse, I., Sinowatz, F. und von den Driesch, A. (2015). *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Verlag Fred Sinowatz, München
- Rutenberg, J. B., Fischer, A., Jia, H. B., Gessler, M., Zhong, T. P., & Mercola, M. (2006). Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors. [Article]. *Development*, 133(21), 4381-4390. doi: 10.1242/dev.02607
- Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D. P., Robertson, E. J., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G., Belmonte, J. C. I. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. [Article]. *Nature*, 394(6693), 545-551.
- Ryckebusch, L., Wang, Z., Bertrand, N., Lin, S. C., Chi, X., Schwartz, R., Zaffran, S., Niederreither, K. (2008). Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2913-2918. doi: 10.1073/pnas.0712344105
- Saga, Y., Kitajima, S., & Miyagawa-Tomita, S. (2000). Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. [Article]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 10(8), 345-352.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., & Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. [Article]. *Development*, 126(15), 3437-3447.
- Saikawa, T., & Carmeliet, E. (1982). Cardiac pacemaker IK2 current - its new interpretation. *Japanese Circulation Journal-English Edition*, 46(8), 809-809.
- Saiz, N., & Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction*, 145(3), R65-R80. doi: 10.1530/rep-12-0381
- Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J., Hamada, H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. [Article]. *Genes & Development*, 15(2), 213-225. doi: 10.1101/gad.851501
- Sakata, H., Sakabe, M., Matsui, H., Kawada, N., Nakatani, K., Ikeda, K., Yamagishi, T., Nakajima, Y. (2007). Rho kinase inhibitor Y27632 affects initial heart myofibrillogenesis in cultured chick blastoderm. [Article]. *Developmental Dynamics*, 236(2), 461-472.
- Sanders, L., Rakovic, S., Lowe, M., Mattick, P. A. D., & Terrar, D. A. (2006). Fundamental importance of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sinoatrial node. *Journal of Physiology-London*, 571(3), 639-649. doi: 10.1113/jphysiol.2005.100305
- Santhanakrishnan, A., & Miller, L. A. (2011). Fluid Dynamics of Heart Development. [Review]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61(1), 1-22. doi: 10.1007/s12013-011-9158-8
- Saravanakumar, M., & Devaraj, H. (2013). Notch signalling in cardiovascularogenesis: insight into their role in early cardiovascular development. *Molecular Biology Reports*, 40(5), 3537-3547. doi: 10.1007/s11033-012-2427-9
- Sasse, P., Zhang, J. B., Cleemann, L., Morad, M., Hescheler, J., & Fleischmann, B. K. (2007). Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. *Journal of General Physiology*, 130(2), 133-144. doi: 10.1085/jgp.200609575

- Sato, A., Marie Scholl, A., Kuhn, E. N., Stadt, H. A., Decker, J. R., Pegram, K., Hutson, M.R., Kirby, M. L. (2012). Corrigendum to “FGF8 signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells” [Dev. Biol. 354 (2011) 18–30]. *Developmental Biology*, 370(1), 164. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.015>
- Sato, A., Scholl, A. M., Kuhn, E. B., Stadt, H. A., Decker, J. R., Pegram, K., Hutson, M.R., Kirby, M. L. (2011). FGF8 signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells. *Developmental Biology*, 354(1), 18-30. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.010>
- Sato, Y., Poynter, G., Huss, D., Filla, M. B., Czirok, A., Rongish, B. J., Little, C.D., Fraser, S.E., Lansford, R. (2010). Dynamic Analysis of Vascular Morphogenesis Using Transgenic Quail Embryos. *PLoS One*, 5(9): e12674. doi: [10.1371/journal.pone.0012674](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012674)
- Scansen, B.A., Schneider, M., Bonagura, J.D. (2015). Sequential segmental classification of feline congenital heart disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 17, 10-52
- Schaefer, K. S., Doughman, Y. Q., Fisher, S. A., & Watanabe, M. (2004). Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. [Article]. *Developmental Dynamics*, 229(3), 489-499. doi: [10.1002/dvdy.10463](http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.10463)
- Scherptong, R. W. C., Jongbloed, M. R. M., Wisse, L. J., Vicente-Steijn, R., Bartelings, M. M., Poelmann, R. E., Schalij, M.J., Gittenberger-De Groot, A. C. (2012). Morphogenesis of outflow tract rotation during cardiac development: The pulmonary push concept. [Article]. *Developmental Dynamics*, 241(9), 1413-1422. doi: [10.1002/dvdy.23833](http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.23833)
- Schiebler, T.H., & Voboril, Z. (1969). On the development of blood vessels in the heart muscle. *Experientia*, 25(8), 845. doi: [10.1007/bf01897911](http://dx.doi.org/10.1007/bf01897911)
- Schlange, T., Schnipkowitz, I., Andree, B., Ebert, A., Zile, M. H., Arnold, H. H., & Brand, T. (2001). Chick CFC controls Lefty1 expression in the embryonic midline and nodal expression in the lateral plate. [Article]. *Developmental Biology*, 234(2), 376-389. doi: [10.1006/dbio.2001.0257](http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2001.0257)
- Schleich, J. M., Dillenseger, J. L., Houyel, L., Almange, C., & Anderson, R. H. (2009). A New Dynamic 3D Virtual Methodology for Teaching the Mechanics of Atrial Septation as Seen in the Human Heart. [Article]. *Anatomical Sciences Education*, 2(2), 69-77. doi: [10.1002/ase.74](http://dx.doi.org/10.1002/ase.74)
- Schlueter, J., & Brand, T. (2007). Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. [Review]. *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1-4), 256-267. doi: [10.1159/000103187](http://dx.doi.org/10.1159/000103187)
- Schlueter, J., & Brand, T. (2009). A right-sided pathway involving FGF8/Snai1 controls asymmetric development of the proepicardium in the chick embryo. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7485-7490. doi: [10.1073/pnas.0811944106](http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0811944106)
- Schlueter, J., Manner, J., & Brand, T. (2006). BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Developmental Biology*, 295(2), 546-558. doi: [10.1016/j.ydbio.2006.03.036](http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.036)
- Schroder, S. S., Tsikolia, N., Weizbauer, A., Hue, I., & Viebahn, C. (2015). Paraxial Nodal Expression Reveals a Novel Conserved Structure of the Left-Right Organizer in Four Mammalian Species. *Cells Tissues Organs*, 201(2), 77-87. doi: [10.1159/000440951](http://dx.doi.org/10.1159/000440951)
- Schrope, D.P. (2015). Prevalence of congenital heart disease in 76,301 mixed-breed dogs and 57,025 mixed-breed cats. *Journal of Veterinary Cardiology*, 17(3), 192-202
- Schuessler, R. B., Boineau, J. P., & Bromberg, B. I. (1996). Origin of the sinus impulse. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 7(3), 263-274. doi: [10.1111/j.1540-8167.1996.tb00524.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1540-8167.1996.tb00524.x)
- Schulte, I., Schlueter, J., Abu-Issa, R., Brand, T., & Manner, J. (2007). Morphological and

- molecular left-right asymmetries in the development of the proepicardium: A comparative analysis on mouse and chick embryos. [Article]. *Developmental Dynamics*, 236(3), 684-695. doi: 10.1002/dvdy.21065
- Schultheiss, T. M., Burch, J. B. E., & Lassar, A. B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. [Article]. *Genes & Development*, 11(4), 451-462.
- Schultheiss, T. M., Xydas, S., & Lassar, A. B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. [Article]. *Development*, 121(12), 4203-4214.
- Schumacher, J. A., Bloomekatz, J., Garavito-Aguilar, Z. V., & Yelon, D. (2013). tall regulates the formation of intercellular junctions and the maintenance of identity in the endocardium. *Developmental Biology*, 383(2), 214-226. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.09.019
- Sedmera, D. (2011). Function and form in the developing cardiovascular system. [Review]. *Cardiovascular Research*, 91(2), 252-259. doi: 10.1093/cvr/cvr062
- Sedmera, D., Harris, B. S., Grant, E., Zhang, N., Jourdan, J., Kurkova, D., & Gourdie, R. G. (2008). Cardiac expression patterns of endothelin-converting enzyme (ECE): Implications for conduction system development. *Developmental Dynamics*, 237(6), 1746-1753. doi: 10.1002/dvdy.21572
- Sedmera, D., Pexieder, T., Hu, N., & Clark, E. B. (1997). Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *The Anatomical Record*, 248(3), 421-432. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(199707)248:3<421::aid-ar15>3.0.co;2-r
- Sedmera, D., Pexieder, T., Rychterova, V., Hu, N., & Clark, E. B. (1999). Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions. *Anatomical Record*, 254(2), 238-252. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(19990201)254:2<238::aid-ar10>3.0.co;2-v
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R. P., & Anderson, R. H. (2000). Developmental patterning of the myocardium. *Anatomical Record*, 258(4), 319-337. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(20000401)258:4<319::aid-ar1>3.0.co;2-o
- Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Coppen, S. R., Kubalak, S. W., Gourdie, R. G., & Thompson, R. P. (2003). Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 274A(1), 773-777. doi: 10.1002/ar.a.10085
- Sedmera, D., Wessels, A., Trusk, T. C., Thompson, R. P., Hewett, K. W., & Gourdie, R. G. (2006). Changes in activation sequence of embryonic chick atria correlate with developing myocardial architecture. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), H1646-H1652. doi: 10.1152/ajpheart.01007.2005
- Seidl, W., Schulze, M., Steding, G., & Kluth, D. (1981). A few remarks on the physiology of the chick embryo heart. *Folia Morphologica*, 29(3), 237-242.
- Seidl, W., & Steding, G. (1985). Development of cardiac flow pattern. [Meeting]. *European Heart Journal*, 6 (Abstr. Suppl. 1), 39.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., Hofmann, F. (2000). Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha(1C) (Ca(v)1.2) calcium channel gene in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39193-39199. doi: 10.1074/jbc.M006467200
- Selleck, M. A. J., & Bronnerfraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest – the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, 121(2), 525-538.
- Selleck, M. A. J., Garcia-Castro, M. I., Artinger, K. B., & Bronner-Fraser, M. (1998). Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm. *Development*, 125(24), 4919-4930.
- Sengbusch, J. K., He, W., Pinco, K. A., & Yang, J. T. (2002). Dual functions of alpha 4 beta 1

- integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *Journal of Cell Biology*, 157(5), 873-882. doi: 10.1083/jcb.200203075
- Seo, S., & Kume, T. (2006). Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Developmental Biology*, 296(2), 421-436. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.012
- Sepulveda, J. L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N., & Schwartz, R. J. (2002). Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25775-25782. doi: 10.1074/jbc.M203122200
- Sewell-Loftin, M. K., DeLaughter, D. M., Peacock, J. R., Brown, C. B., Baldwin, H. S., Barnett, J. V., & Merryman, W. D. (2014). Myocardial contraction and hyaluronic acid mechanotransduction in epithelial-to-mesenchymal transformation of endocardial cells. *Biomaterials*, 35(9), 2809-2815. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.051
- Sharma, B., Chang, A., & Red-Horse, K. (2017). Coronary Artery Development: Progenitor Cells and Differentiation Pathways. *Annual Review of Physiology*, Vol 79, 1-19.
- Sharma, P. R., Anderson, R. H., Copp, A. J., & Henderson, D. J. (2004). Spatiotemporal analysis of programmed cell death during mouse cardiac septation. [Article]. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 277A(2), 355-369. doi: 10.1002/ar.a.20006
- Shelton, E. L., & Yutzey, K. E. (2007). Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression. [Article]. *Developmental Biology*, 302(2), 376-388. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.047
- Shelton, E. L., & Yutzey, K. E. (2008). Twist1 function in endocardial cushion cell proliferation, migration, and differentiation during heart valve development. [Article]. *Developmental Biology*, 317(1), 282-295. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.02.037
- Shi, H., O'Reilly, V. C., Moreau, J. L. M., Bewes, T. R., Yam, M. X., Chapman, B. E., Grieve, S.M., Stocker, R., Graham, R.M., Chapman, G., Sparrow, D.B., Dunwoodie, S. L. (2016). Gestational stress induces the unfolded protein response, resulting in heart defects. *Development*, 143(14), 2561-2572. doi: 10.1242/dev.136820
- Shi, W. M., Wymore, R., Yu, H. G., Wu, J. Y., Wymore, R. T., Pan, Z. M., Robinson, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D., Cohen, I. S. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circulation Research*, 85(1), E1-E6.
- Shi, Y. F., Varner, V. D., & Taber, L. A. (2015). Why is cytoskeletal contraction required for cardiac fusion before but not after looping begins? *Physical Biology*, 12(1): 016012. doi: 10.1088/1478-3975/12/1/016012
- Shi, Y. F., Yao, J., Young, J. M., Fee, J. A., Perucchio, R., & Taber, L. A. (2014). Bending and twisting the embryonic heart: a computational model for c-looping based on realistic geometry. *Frontiers in Physiology*, 5: 297. doi: 10.3389/fphys.2014.00297
- Shimizu, H., & Fujisawa, T. (2003). Peduncle of Hydra and the heart of higher organisms share a common ancestral origin. *Genesis*, 36(4), 182-186. doi: 10.1002/gene.10213
- Shinagawa, Y., Satoh, H., & Noma, A. (2000). The sustained inward current and inward rectifier K<sup>+</sup> current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *Journal of Physiology-London*, 523(3), 593-605. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00593.x
- Shiraishi, I., Takamatsu, T., Minamikawa, T., & Fujita, S. (1992). 3-D observation of actin filaments during cardiac myofibrillogenesis in chick embryo using a confocal laser scanning microscope. *Anatomy and Embryology*, 185(4), 401-408.
- Singh, M. K., Christoffels, V. M., Dias, J. M., Trowe, M. O., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Burger, A., Ericson, J., Kispert, A. (2005). Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. [Article]. *Development*, 132(12), 2697-2707. doi: 10.1242/dev.01854
- Singh, M. K., Li, Y., Li, S. R., Cobb, R. M., Zhou, D., Lu, M. M., Epstein, J.A., Morrisey,

- E.E., Gruber, P. J. (2010). Gata4 and Gata5 Cooperatively Regulate Cardiac Myocyte Proliferation in Mice. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 285(3), 1765-1772. doi: 10.1074/jbc.M109.038539
- Singh, R., Hoogaars, W. M., Barnett, P., Grieskamp, T., Rana, M. S., Buermans, H., Farin, H. F., Petry, M., Heallen, T., Martin, J. F., Moorman, A. F. M., t Hoen, P. A. C., Kispert, A., Christoffels, V. M. (2012). Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation. [Article]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(8), 1377-1389. doi: 10.1007/s00018-011-0884-2
- Singh, R., Horsthuis, T., Farin, H. F., Grieskamp, T., Norden, J., Petry, M., Wakker, V., Moorman, A.F.M., Christoffels, V.M., Kispert, A. (2009). Tbx20 Interacts With Smads to Confine Tbx2 Expression to the Atrioventricular Canal. [Article]. *Circulation Research*, 105(5), 442-452. doi: 10.1161/circresaha.109.196063
- Singla, V., & Reiter, J. F. (2006). The primary cilium as the cell's antenna: Signaling at a sensory organelle. *Science*, 313(5787), 629-633. doi: 10.1126/science.1124534
- Sirbu, I. O., Zhao, X. L., & Duester, G. (2008). Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating *Isl1* through the *Fgf8* pathway. *Developmental Dynamics*, 237(6), 1627-1635. doi: 10.1002/dvdy.21570
- Sizarov, A., Anderson, R. H., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. M. (2010). Three-Dimensional and Molecular Analysis of the Venous Pole of the Developing Human Heart. [Article]. *Circulation*, 122(8), 798-807. doi: 10.1161/circulationaha.110.953844
- Sizarov, A., Devalla, H. D., Anderson, R. H., Passier, R., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. M. (2011). Molecular Analysis of Patterning of Conduction Tissues in the Developing Human Heart. [Article]. *Circulation-Arrhythmia and Electrophysiology*, 4(4), 532-542. doi: 10.1161/circep.111.963421
- Sizarov, A., Lamers, W. H., Mohun, T. J., Brown, N. A., Anderson, R. H., & Moorman, A. F. M. (2012). Three-dimensional and molecular analysis of the arterial pole of the developing human heart. [Article]. *Journal of Anatomy*, 220(4), 336-349. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01474.x
- Slough, J., Cooney, L., & Brueckner, M. (2008). Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis. [Article]. *Developmental Dynamics*, 237(9), 2304-2314. doi: 10.1002/dvdy.21669
- Smart, N., Risebro, C. A., Melville, A. A. D., Moses, K., Schwartz, R. J., Chien, K. R., & Riley, P. R. (2007). Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Thymosins in Health and Disease: First International Symposium* (Vol. 1112, pp. 171-188).
- Smith, C. L., Baek, S. T., Sung, C. Y., & Tallquist, M. D. (2011). Epicardial-Derived Cell Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fate Specification Require PDGF Receptor Signaling. *Circulation Research*, 108(12), E15-E26. doi: 10.1161/circresaha.110.235531
- Smith, S. M., Dickman, E. D., Thompson, R. P., Sinning, A. R., Wunsch, A. M., & Markwald, R. R. (1997). Retinoic acid directs cardiac laterality and the expression of early markers of precardiac asymmetry. [Article]. *Developmental Biology*, 182(1), 162-171.
- Snarr, B. S., Kern, C. B., & Wessels, A. (2008). Origin and Fate of Cardiac Mesenchyme. [Review]. *Developmental Dynamics*, 237(10), 2804-2819. doi: 10.1002/dvdy.21725
- Snarr, B. S., O'Neal, J. L., Chintalapudi, M. R., Wirrig, E. E., Phelps, A. L., Kubalak, S. W., & Wessels, A. (2007a). *Isl1* expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development. [Editorial Material]. *Circulation Research*, 101(10), 971-974. doi: 10.1161/circresaha.107.162206
- Snarr, B. S., Wirrig, E. E., Phelps, A. L., Trusk, T. C., & Wessels, A. (2007b). A spatiotemporal evaluation of the contribution of the dorsal mesenchymal protrusion to cardiac development. [Article]. *Developmental Dynamics*, 236(5), 1287-1294. doi:

10.1002/dvdy.21074

- Snider, P., Standley, K. N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., & Conway, S. J. (2009). Origin of Cardiac Fibroblasts and the Role of Periostin. *Circulation Research*, *105*(10), 934-947. doi: 10.1161/circresaha.109.201400
- Somi, S., Buffing, A. A. M., Moorman, A. F. M., & Van Den Hoff, M. J. B. (2004). Dynamic patterns of expression of BMP isoforms 2, 4, 5, 6, and 7 during chicken heart development. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, *279A*(1), 636-651. doi: 10.1002/ar.a.20031
- Soshnikova, N., Dewaele, R., Janvier, P., Krumlauf, R., & Duboule, D. (2013). Duplications of hox gene clusters and the emergence of vertebrates. *Developmental Biology*, *378*(2), 194-199. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.03.004
- Soufan, A. T., van den Berg, G., Ruijter, J. M., de Boer, P. A. J., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2006). Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. [Article]. *Circulation Research*, *99*(5), 545-552. doi: 10.1161/01.res.0000239407.45137.97
- Soufan, A. T., van den Hoff, M. J. B., Ruijter, J. M., de Boer, P. A. J., Hagoort, J., Webb, S., Anderson, R.H., Moorman, A. F. M. (2004). Reconstruction of the patterns of gene expression in the developing mouse heart reveals an architectural arrangement that facilitates the understanding of atrial malformations and arrhythmias. [Article]. *Circulation Research*, *95*(12), 1207-1215. doi: 10.1161/01.RES.0000150852.04747.e1
- Speder, P., Adam, G., & Noselli, S. (2006). Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*. *Nature*, *440*(7085), 803-807. doi: 10.1038/nature04623
- Spicer, D. E., Bridgeman, J. M., Brown, N. A., Mohun, T. J., & Anderson, R. H. (2014). The anatomy and development of the cardiac valves. *Cardiology in the Young*, *24*(6), 1008-1022. doi: 10.1017/s1047951114001942
- Sridurongrit, S., Larsson, J., Schwartz, R., Ruiz-Lozano, P., & Kaartinen, V. (2008). Signaling via the Tgf-beta type I receptor Alk5 in heart development. *Developmental Biology*, *322*(1), 208-218. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.07.038
- Srivastava, D. (1999). HAND proteins: Molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. [Article]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *9*(1-2), 11-18.
- Srivastava, D., Cserjesi, P., & Olson, E. N. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. [Article]. *Science*, *270*(5244), 1995-1999.
- Stadtfeld, M., Ye, M., & Graf, T. (2007). Identification of interventricular septum precursor cells in the mouse embryo. [Article]. *Developmental Biology*, *302*(1), 195-207. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.025
- Stalsberg, H. (1969). Regional mitotic activity in precardiac mesoderm and differentiating heart tube in chick embryo. [Article]. *Developmental Biology*, *20*(1), 18-45.
- Stalsberg, H. (1970). Mechanism of dextral looping of embryonic heart. [Article]. *American Journal of Cardiology*, *25*(3), 265-271.
- Stalsberg, H., & De Haan, R. L. (1968). Endodermal movements during foregut formation in chick embryo. [Article]. *Developmental Biology*, *18*(2), 198-215.
- Stalsberg, H., & De Haan, R. L. (1969). Precardiac areas and formation of tubular heart in chick embryo. [Article]. *Developmental Biology*, *19*(2), 128-159.
- Stankunas, K., Ma, G. K., Kuhnert, F. J., Kuo, C. J., & Chang, C. P. (2010). VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development. [Article]. *Developmental Biology*, *347*(2), 325-336. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.08.030
- Stankunas, K., Shang, C., Twu, K. Y., Kao, S. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sanyal, M., Selleri, L., Cleary, M.L., Chang, C. P. (2008). Pbx/Meis deficiencies demonstrate multigenetic origins of congenital heart disease. *Circulation Research*, *103*(7), 702-709. doi: 10.1161/circresaha.108.175489
- Stekelenburg-de Vos, S., Ursem, N. T. C., Hop, W. C. J., Wladimiroff, J. W., Gittenberger-de

- Groot, A. C., & Poelmann, R. E. (2003). Acutely altered hemodynamics following venous obstruction in the early chick embryo. [Article]. *Journal of Experimental Biology*, 206(6), 1051-1057. doi: 10.1242/jeb.00216
- Stennard, F. A., Costa, M. W., Elliott, D. A., Rankin, S., Haast, S. J. P., Lai, D., McDonald, L. P. A., Niederreither, K., Dolle, P., Bruneau, B. G., Zorn, A. M., Harvey, R. P. (2003). Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. [Review]. *Developmental Biology*, 262(2), 206-224. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00385-3
- Stennard, F. A., Costa, M. W., Lai, D., Biben, C., Furtado, M. B., Solloway, M. J., McCulley, D. J., Leimena, C., Preis, J. I., Dunwoodie, S. L., Elliott, D. E., Prall, O. W. J., Black, B. L., Fatkin, D., Harvey, R. P. (2005). Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. [Article]. *Development*, 132(10), 2451-2462. doi: 10.1242/dev.01799
- Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S., & Mayor, R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development*, 136(5), 771-779. doi: 10.1242/dev.029017
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (2003). The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15235-15240. doi: 10.1073/pnas.2434235100
- Stottmann, R. W., Choi, M., Mishina, Y., Meyers, E. N., & Klingensmith, J. (2004). BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. [Article]. *Development*, 131(9), 2205-2218. doi: 10.1242/dev.01086
- Stuckey, D. W., Clements, M., Di-Gregorio, A., Senner, C. E., Le Tissier, P., Srinivas, S., & Rodriguez, T. A. (2011a). Coordination of cell proliferation and anterior-posterior axis establishment in the mouse embryo. *Development*, 138(8), 1521-1530. doi: 10.1242/dev.063537
- Stuckey, D. W., Di Gregorio, A., Clements, M., & Rodriguez, T. A. (2011b). Correct Patterning of the Primitive Streak Requires the Anterior Visceral Endoderm. *PLoS One*, 6(3): e17620. doi: 10.1371/journal.pone.0017620
- Stuckmann, I., Evans, S., & Lassar, A. B. (2003). Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Developmental Biology*, 255(2), 334-349. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00078-7
- Stuhlmiller, T. J., & Garcia-Castro, M. I. (2012). FGF/MAPK signaling is required in the gastrula epiblast for avian neural crest induction. *Development*, 139(2), 289-300. doi: 10.1242/dev.070276
- Sugi, Y., Barnet, J. V., & Markwald, R. R. (2004a). Endodermal regulation of endocardial precursor cell formation involves TGF beta pathway. *Faseb Journal*, 18(5), A779-A779.
- Sugi, Y., Ito, N., Szebenyi, G., Myers, K., Fallon, J. F., Mikawa, T., & Markwald, R. R. (2003). Fibroblast growth factor (FGF)-4 can induce proliferation of cardiac cushion mesenchymal cells during early valve leaflet formation. [Article]. *Developmental Biology*, 258(2), 252-263. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00099-x
- Sugi, Y., & Lough, J. (1995). Activin A and FGF2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro. [Article]. *Developmental Biology*, 168(2), 567-574.
- Sugi, Y., & Markwald, R. R. (1996). Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm. [Article]. *Developmental*

- Biology*, 175(1), 66-83.
- Sugi, Y., Yamamura, H., Okagawa, H., & Markwald, R. R. (2004b). Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice. [Article]. *Developmental Biology*, 269(2), 505-518. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.045
- Sugishita, Y., Leifer, D. W., Agani, F., Watanabe, M., & Fisher, S. A. (2004). Hypoxia-responsive signaling regulates the apoptosis-dependent remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract. [Article]. *Developmental Biology*, 273(2), 285-296. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.05.036
- Sugrue, K. F., & Zohn, I. E. (2017). Mechanism for generation of left isomerism in *Ccdc40* mutant embryos. *PLoS One*, 12(2): e0171180. doi: 10.1371/journal.pone.0171180
- Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M., & Martin, G. R. (1999). Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. [Article]. *Genes & Development*, 13(14), 1834-1846.
- Sun, Y. F., Liang, X. Q., Najafi, N., Cass, M., Lin, L. Z., Cai, C. L., Chen, J., Evans, S. M. (2007). Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. [Article]. *Developmental Biology*, 304(1), 286-296. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.048
- Sung, Y. H., Baek, I. J., Kim, Y. H., Gho, Y. S., Oh, S. P., Lee, Y. J., & Lee, H. W. (2016). *PIERCE1* is critical for specification of left-right asymmetry in mice. *Scientific Reports*, 6: 27932. doi: 10.1038/srep27932
- Supp, D. M., Brueckner, M., Kuehn, M. R., Witte, D. P., Lowe, L. A., McGrath, J., Corrales, J., Potter, S. S. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development*, 126(23), 5495-5504.
- Supp, D. M., Witte, D. P., Potter, S. S., & Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature*, 389(6654), 963-966. doi: 10.1038/40140
- Sweeney, C., Fambrough, D., Huard, C., Diamonti, A. J., Lander, E. S., Cantley, L. C., & Carraway, K. L. (2001). Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22685-22698. doi: 10.1074/jbc.M100602200
- Szabo, E., Viragh, S., & Challice, C. E. (1986). The structure of the atrioventricular conducting system in the avian heart. *Anatomical Record*, 215(1), 1-9. doi: 10.1002/ar.1092150102
- Taber, L. A. (1998). Mechanical aspects of cardiac development. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 69(2-3), 237-255. doi: 10.1016/s0079-6107(98)00010-8
- Taber, L. A. (2006). Biophysical mechanisms of cardiac looping. [Article]. *International Journal of Developmental Biology*, 50(2-3), 323-332. doi: 10.1387/ijdb.052045lt
- Taber, L. A., Voronov, D. A., & Ramasubramanian, A. (2010). The role of mechanical forces in the torsional component of cardiac looping. In R. Beyar & A. Landesberg (Eds.), *Analysis of Cardiac Development: From Embryo to Old Age* (Vol. 1188, pp. 103-110). Blackwell Publishing, Oxford.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols*, 2(12), 3081-3089. doi: 10.1038/nprot.2007.418
- Takahashi, M., Terasako, Y., Yanagawa, N., Kai, M., Yamagishi, T., & Nakajima, Y. (2012). Myocardial progenitors in the pharyngeal regions migrate to distinct conotruncal regions. [Article]. *Developmental Dynamics*, 241(2), 284-293. doi: 10.1002/dvdy.23714
- Takamatsu, A., Ishikawa, T., Shinohara, K., & Hamada, H. (2013). Asymmetric rotational stroke in mouse node cilia during left-right determination. *Physical Review E*, 87(5):

050701. doi: 10.1103/PhysRevE.87.050701
- Takao, D., Nemoto, T., Abe, T., Kiyonari, H., Kajiura-Kobayashi, H., Shiratori, H., & Nonaka, S. (2013). Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation. *Developmental Biology*, 376(1), 23-30. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.018
- Takebayashi-Suzuki, K., Yanagisawa, M., Gourdie, R. G., Kanzawa, N., & Mikawa, T. (2000). In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1. *Development*, 127(16), 3523-3532.
- Takeichi, M., Nimura, K., Mori, M., Nakagami, H., & Kaneda, Y. (2013). The Transcription Factors Tbx18 and Wt1 Control the Epicardial Epithelial-Mesenchymal Transition through Bi-Directional Regulation of Slug in Murine Primary Epicardial Cells. [Article]. *PLoS One*, 8(2): e57829. doi: 10.1371/journal.pone.0057829
- Takeuchi, J. K., Ohgi, M., Koshiba-Takeuchi, K., Shiratori, H., Sakaki, I., Ogura, K., Saijoh, Y., Ogura, T. (2003). Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. [Article]. *Development*, 130(24), 5953-5964. doi: 10.1242/dev.00797
- Tallini, Y. N., Ohkura, M., Choi, B. R., Ji, G. J., Imoto, K., Doran, R., Lee, J., Plan, P., Wilson, J., Xin, H. B., Sanbe, A., Gulick, J., Mathai, J., Robbins, J., Salama, G., Nakai, J., Kotlikoff, M. I. (2006). Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca<sup>2+</sup> indicator GCaMP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4753-4758. doi: 10.1073/pnas.0509378103
- Tam, P. P. L., Parameswaran, M., Kinder, S. J., & Weinberger, R. P. (1997). The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: The role of ingression and tissue movement during gastrulation. [Article]. *Development*, 124(9), 1631-1642.
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., & Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 65(3), 550-563. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.12.002
- Tan, H., Biechler, S., Junor, L., Yost, M. J., Dean, D., Li, J., Potts, J.D., Goodwin, R. L. (2013). Fluid flow forces and rhoA regulate fibrous development of the atrioventricular valves. *Developmental Biology*, 374(2), 345-356. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.023>
- Tan, H., Junor, L., Price, R. L., Norris, R. A., Potts, J. D., & Goodwin, R. L. (2011). Expression and Deposition of Fibrous Extracellular Matrix Proteins in Cardiac Valves during Chick Development. [Article]. *Microscopy and Microanalysis*, 17(1), 91-100. doi: 10.1017/s1431927610094365
- Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H., & Saijoh, Y. (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes & Development*, 21(24), 3272-3282. doi: 10.1101/gad.1623907
- Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N., & Izumo, S. (1999). The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. [Article]. *Development*, 126(6), 1269-1280.
- Tanaka, M., Yamasaki, N., & Izumo, S. (2000). Phenotypic characterization of the murine Nkx2.6 homeobox gene by gene targeting. [Article]. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2874-2879.
- Tanaka, Y., Okada, Y., & Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature*, 435(7039), 172-177. doi: 10.1038/nature03494
- Tang, Y. F., Urs, S., Boucher, J., Bernaiche, T., Venkatesh, D., Spicer, D. B., Vary, C.P.H., Liaw, L. (2010). Notch and Transforming Growth Factor-beta (TGF beta) Signaling

- Pathways Cooperatively Regulate Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17556-17563. doi: 10.1074/jbc.M109.076414
- Tao, J., Doughman, Y., Yang, K., Ramirez-Bergeron, D., & Watanabe, M. (2013). Epicardial HIF signaling regulates vascular precursor cell invasion into the myocardium. *Developmental Biology*, 376(2), 136-149. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.026
- Tarbell, J. M., & Ebong, E. E. (2008). The Endothelial Glycocalyx: A Mechano-Sensor and -Transducer. *Science Signaling*, 1(40): 8. doi: 10.1126/scisignal.140pt8
- Tasaka, H., Krug, E. L., & Markwald, R. R. (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. [Article]. *Anatomical Record*, 246(1), 107-113. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(199609)246:1<107::aid-ar12>3.0.co;2-t
- Temple, I. P., Inada, S., Dobrzynski, H., & Boyett, M. R. (2013). Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm*, 10(2), 297-304. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.10.020
- ten Dijke, P., Egorova, A. D., Goumans, M., Poelmann, R. E., & Hierck, B. P. (2012). TGF-beta Signaling in Endothelial-to-Mesenchymal Transition: The Role of Shear Stress and Primary Cilia. *Science Signaling*, 5(212): 2. doi: 10.1126/scisignal.2002722
- Teng, G. Q., Zhao, X., Lees-Miller, J. P., Belke, D., Shi, C. H., Chen, Y. X., O'Brien, E.R., Fedak, P.W., Bracey, N., Cross, J.C., Duff, H. J. (2015). Role of Mutation and Pharmacologic Block of Human KCNH2 in Vasculogenesis and Fetal Mortality Partial Rescue by Transforming Growth Factor-beta. *Circulation-Arrhythmia and Electrophysiology*, 8(2), 420-428. doi: 10.1161/circep.114.001837
- Tessari, A., Pietrobon, M., Notte, A., Cifelli, G., Gage, P. J., Schneider, M. D., Lembo, G., Campione, M. (2008). Myocardial Pitx2 differentially regulates the left atrial identity and ventricular asymmetric remodeling programs. *Circulation Research*, 102(7), 813-822. doi: 10.1161/circresaha.107.163188
- Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S. H., Izumo, S., Fujiwara, Y., Orkin, S. H. (2000). FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell*, 101(7), 729-739. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80885-5
- Theveniau-Ruissy, M., Dandonneau, M., Mesbah, K., Ghez, O., Mattei, M. G., Miquerol, L., & Kelly, R. G. (2008). The del22q11.2 candidate gene Tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. [Article]. *Circulation Research*, 103(2), 142-148. doi: 10.1161/circresaha.108.172189
- Thomas, P. S., Rajderkar, S., Lane, J., Mishina, Y., & Kaartinen, V. (2014). AcvR1-mediated BMP signaling in second heart field is required for arterial pole development: Implications for myocardial differentiation and regional identity. [Article]. *Developmental Biology*, 390(2), 191-207. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.03.008
- Thomas, T., Yamagishi, H., Overbeek, P. A., Olson, E. N., & Srivastava, D. (1998). The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness. *Developmental Biology*, 196(2), 228-236. doi: 10.1006/dbio.1998.8849
- Thompson, R. P., Abercrombie, V., & Wong, M. (1987). Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: Movements of autoradiographic tattoos during septation. *The Anatomical Record*, 218(4), 434-440. doi: 10.1002/ar.1092180411
- Tian, X. Y., Hu, T. Y., He, L. J., Zhang, H., Huang, X. Z., Poelmann, R. E., Liu, W.B., Yang, Z., Yan, Y., Pu, W.T., Zhou, B. (2013a). Peritruncal Coronary Endothelial Cells Contribute to Proximal Coronary Artery Stems and Their Aortic Orifices in the Mouse Heart. *PLoS One*, 8(11): e80857. doi: 10.1371/journal.pone.0080857
- Tian, X. Y., Hu, T. Y., Zhang, H., He, L. J., Huang, X. Z., Liu, Q. Z., Yu, W., He, L., Yang, Z. Z., Zhang, Z., Zhong, T. P., Yang, X., Yang, Z., Yan, Y., Baldini, A., Sun, Y. F.,

- Lu, J., Schwartz, R. J., Evans, S. M., Gittenberger-de Groot, A. C., Red-Horse, K., Zhou, B. (2013b). Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to form coronary arteries. *Cell Research*, 23(9), 1075-1090. doi: 10.1038/cr.2013.83
- Tibayan, F. A., Louey, S., Jonker, S., Espinoza, H., Chattergoon, N., You, F., Thornburg, K.L., Giraud, G. (2015). Increased systolic load causes adverse remodeling of fetal aortic and mitral valves. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 309(12), R1490-R1498. doi: 10.1152/ajpregu.00040.2015
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J. M., Diez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J.C., de la Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. [Article]. *Genes & Development*, 18(1), 99-115. doi: 10.1101/gad.276304
- Togi, K., Kawamoto, T., Yamauchi, R., Yoshida, Y., Kita, T., & Tanaka, M. (2004). Role of Hand1/eHAND in the dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart. [Article]. *Molecular and Cellular Biology*, 24(11), 4627-4635. doi: 10.1128/mcb.24.11.4627-4635.2004
- Tokuyasu, K. T., & Maher, P. A. (1987). Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. 1. Presence of immunofluorescent titin spots in premyofibril stages. [Article]. *Journal of Cell Biology*, 105(6), 2781-2793.
- Tomanek, R. J., Christensen, L. P., Simons, M., Murakami, M., Zheng, W., & Schatteman, G. C. (2010). Embryonic Coronary Vasculogenesis and Angiogenesis Are Regulated by Interactions Between Multiple FGFs and VEGF and Are Influenced by Mesenchymal Stem Cells. *Developmental Dynamics*, 239(12), 3182-3191. doi: 10.1002/dvdy.22460
- Tomanek, R. J., Hansen, H. K., & Christensen, L. P. (2008). Temporally expressed PDGF and FGF-2 regulate embryonic coronary artery formation and growth. [Article]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 28(7), 1237-1243. doi: 10.1161/atvbaha.108.166454
- Tomanek, R. J., Holifield, J. S., Reiter, R. S., Sandra, A., & Lin, J. J. C. (2002). Role of VEGF family members and receptors in coronary vessel formation. *Developmental Dynamics*, 225(3), 233-240. doi: 10.1002/dvdy.10158
- Tomanek, R. J., Ishii, Y., Holifield, J. S., Sjogren, C. L., Hansen, H. K., & Mikawa, T. (2006). VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo. *Circulation Research*, 98(7), 947-953. doi: 10.1161/01.RES.0000216974.75994.da
- Tomanek, R. J., Lund, D. D., & Yue, X. P. (2003). Hypoxic induction of myocardial vascularization during development. *Hypoxia: Through the Lifecycle*, 543, 139-149.
- Tomanek, R. J., Sandra, A., Zheng, W., Brock, T., Bjercke, R. J., & Holifield, J. S. (2001). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circulation Research*, 88(11), 1135-1141. doi: 10.1161/hh1101.091191
- Tonge, M. (1869). Observations on the Development of the Semilunar Valves of the Aorta and Pulmonary Artery of the Heart of the Chick. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 159, 387-411.
- Torlopp, A., Schlueter, J., & Brand, T. (2010). Role of Fibroblast Growth Factor Signaling During Proepicardium Formation in the Chick Embryo. *Developmental Dynamics*, 239(9), 2393-2403. doi: 10.1002/dvdy.22384
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Makino, N., Takamatsu, H., Takegahara, N., Suto, F., Hori, M., Fujisawa, H., Kumanogoh, A., Kikutani, H. (2008). Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. [Article]. *Developmental Biology*, 321(1), 251-262. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.028
- Trembley, M. A., Velasquez, L. S., Bentley, K. L. D., & Small, E. M. (2015). Myocardin-

- related transcription factors control the motility of epicardium-derived cells and the maturation of coronary vessels. *Development*, 142(1), 21-30. doi: 10.1242/dev.116418
- Trinh, L. A., & Stainier, D. Y. R. (2004). Fibronectin regulates epithelial organization during myocardial migration in zebrafish. [Article]. *Developmental Cell*, 6(3), 371-382.
- Tsikolia, N., Schroeder, S., Schwartz, P., & Viebahn, C. (2012). Paraxial left-sided nodal expression and the start of left-right patterning in the early chick embryo. *Differentiation*, 84(5), 380-391. doi: 10.1016/j.diff.2012.09.001
- Tsuda, T., Majumder, K., & Linask, K. K. (1998). Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Developmental Genetics*, 23(3), 203-214. doi: 10.1002/(sici)1520-6408(1998)23:3<203::aid-dvg6>3.0.co;2-6
- Tsukui, T., Capdevila, J., Tamura, K., Ruiz-Lozano, P., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Ruiz-Lozano, P., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Magallon, J., Chandraratna, R. A. S., Chien, K., Blumberg, B., Evans, R. M., Belmonte, J. C. I. (1999). Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the Shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11376-11381. doi: 10.1073/pnas.96.20.11376
- Tzahor, E., & Lassar, A. B. (2001). Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. [Article]. *Genes & Development*, 15(3), 255-260.
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G.Y., DeLisser, H., Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437(7057), 426-431. doi: 10.1038/nature03952
- Udan, R. S., Vadakkan, T. J., & Dickinson, M. E. (2013). Dynamic responses of endothelial cells to changes in blood flow during vascular remodeling of the mouse yolk sac. *Development*, 140(19), 4041-4050. doi: 10.1242/dev.096255
- Uddin, M. K. M., Kimura, W., Ishikura, T., Koseki, H., Yoshida, N., Islam, M. J., Amin, M.B., Nakamura, K., Wu, Y.X., Sato, E., Aoto, K., Miura, N. (2015). Foxc2 in pharyngeal arch mesenchyme is important for aortic arch artery remodelling and ventricular septum formation. *Biomedical Research-Tokyo*, 36(4), 235-245.
- van den Akker, N. M. S., Caolo, V., Wisse, L. J., Peters, P., Poelmann, R. E., Carmeliet, P., Molin, D.G.M., Groot, A. (2008a). Developmental coronary maturation is disturbed by aberrant cardiac vascular endothelial growth factor expression and Notch signalling. *Cardiovascular Research*, 78(2), 366-375. doi: 10.1093/cvr/cvm108
- van den Akker, N. M. S., Molin, D. G. M., Peters, P., Maas, S., Wisse, L. J., van Bremp, R., van Munsteren, C.J., Bartelings, M.M., Poelmann, R.E., Carmeliet, P., Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Tetralogy of Fallot and alterations in vascular endothelial growth factor-A signaling and Notch signaling in mouse embryos solely expressing the VEGF120 isoform. [Article]. *Circulation Research*, 100(6), 842-849. doi: 10.1161/01.res.0000261656.04773.39
- Van den Akker, N. M. S., Winkel, L. C. J., Nisancioglu, M. H., Maas, S., Wisse, L. J., Armulik, A., Poelmann, R.E., Lie-Venema, H., Betsholtz, C., Gittenberger-de Groot, A. C. (2008b). PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: Its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation. [Article]. *Developmental Dynamics*, 237(2), 494-503. doi: 10.1002/dvdy.21436
- van den Ameerle, J., Tiberi, L., Bondue, A., Paulissen, C., Herpoel, A., Iacovino, M., Kyba, M., Blanpain, C., Vanderhaeghen, P. (2012). Eomesodermin induces Mesp1 expression and cardiac differentiation from embryonic stem cells in the absence of Activin. *Embo Reports*, 13(4), 355-362. doi: 10.1038/embor.2012.23
- Van den Arker, N. M. S., Lie-Venema, H., Maas, S., Eralp, I., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., & Groot, A. C. G. (2005). Platelet-derived growth factors in the developing avian

- heart and maturing coronary vasculature. [Article]. *Developmental Dynamics*, 233(4), 1579-1588. doi: 10.1002/dvdy.20476
- van den Berg, G., Abu-Issa, R., de Boer, B. A., Hutson, M. R., de Boer, P. A. J., Soufan, A. T., .Ruijter, J.M., Kirby, M.L., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A. F. M. (2009). A Caudal Proliferating Growth Center Contributes to Both Poles of the Forming Heart Tube. [Article]. *Circulation Research*, 104(2), 179-188. doi: 10.1161/circresaha.108.185843
- van den Berg, G., & Moorman, A. F. M. (2011). Development of the Pulmonary Vein and the Systemic Venous Sinus: An Interactive 3D Overview. [Article]. *Plos One*, 6(7): e22055. doi: 10.1371/journal.pone.0022055
- van den Hoff, M. J. B., Kruithof, B. P. T., & Moorman, A. F. M. (2004). Making more heart muscle. [Review]. *Bioessays*, 26(3), 248-261. doi: 10.1002/bies.20006
- van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M., Ruijter, J. M., Lamers, W. H., Bennington, R. W., Markwald, R. R., & Wessels, A. (1999). Myocardialization of the cardiac outflow tract. [Article]. *Developmental Biology*, 212(2), 477-490. doi: 10.1006/dbio.1999.9366
- Van der Heiden, K., Groenendijk, B. C. W., Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., & Hierck, B. P. (2006). Primary cilia on embryonic endocardium: Biosensors for blood flow. *Vascular Pharmacology*, 45(3), 181-182. doi: 10.1016/j.vph.2006.08.024
- van der Linde, D., Konings, E. E. M., Slager, M. A., Witsenburg, M., Helbing, W. A., Takkenberg, J. J. M., & Roos-Hesselink, J. W. (2011). Birth Prevalence of Congenital Heart Disease Worldwide A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(21), 2241-2247. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.025
- Van Handel, B., Montel-Hagen, A., Sasidharan, R., Nakano, H., Ferrari, R., Boogerd, C. J., Schredelseker, J., Wang, Y. L., Hunter, S., Org, T., Zhou, J., Li, X. M., Pellegrini, M., Chen, J. N., Orkin, S. H., Kurdistani, S. K., Evans, S. M., Nakano, A., Mikkola, H. K. A. (2012). Scl Represses Cardiomyogenesis in Prospective Hemogenic Endothelium and Endocardium. *Cell*, 150(3), 590-605. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.026
- Van Mierop, L.H.S. (1967). Location of pacemaker in chick embryo heart at time of initiation of heart beat. *American Journal of Physiology*, 212(2), 407-415.
- Van Mierop, L.H.S., Dekker, A., & Bruins, C.L.D.C. (1978). Embryology and Teratology of the Heart and the Great Arteries: Conducting System: Transposition of the Great Arteries: Ductus Arteriosus. Springer Netherlands Verlag, Den Haag.
- Van Mierop, L.H.S. (1979). Morphological development of the heart. In: Handbook of Physiology: The Cardiovascular System. 1. The Heart. R.M. Berne (Ed.). American Physiological Society, Bethesda, MD, pp.1-28
- van Veen, T. A. B., van Rijen, H. V. M., & Opthof, T. (2001). Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovascular Research*, 51(2), 217-229. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00324-8
- van Veen, T. A. B., van Rijen, H. V. M., van Kempen, M. J. A., Miquerol, L., Opthof, T., Gros, D., Vos, M.A., Jongsma, H.J., de Bakker, J. M. T. (2005). Discontinuous conduction in mouse bundle branches is caused by bundle-branch architecture. *Circulation*, 112(15), 2235-2244. doi: 10.1161/circulationaha.105.547893
- van Wijk, B., van den Berg, G., Abu-Issa, R., Barnett, P., van der Velden, S., Schmidt, M., Ruijter, J.M., Kirby, M.L., Moorman, A.F.M., van den Hoff, M. J. B. (2009). Epicardium and Myocardium Separate From a Common Precursor Pool by Crosstalk Between Bone Morphogenetic Protein- and Fibroblast Growth Factor-Signaling Pathways. [Article]. *Circulation Research*, 105(5), 431-441. doi: 10.1161/circresaha.109.203083
- VanDusen, N. J., Casanovas, J., Vincentz, J. W., Firulli, B. A., Osterwalder, M., Lopez-Rios, J., Zeller, R., Zhou, B., Grego-Bessa, J., de la Pompa, J.L., Shou, W.N., Firulli, A. B. (2014). Hand2 Is an Essential Regulator for Two Notch-Dependent Functions within

- the Embryonic Endocardium. *Cell Reports*, 9(6), 2071-2083. doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.021
- Vanginneken, A. C. G., & Giles, W. (1991). Voltage clamp measurements of the hyperpolarization-inward current  $I_f$  in single cells from rabbit sinoatrial node. *Journal of Physiology-London*, 434, 57-83.
- VanKempen, M. J. A., Vermeulen, J. L. M., Moorman, A. F. M., Gros, D., Paul, D. L., & Lamers, W. H. (1996). Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. [Article]. *Cardiovascular Research*, 32(5), 886-900. doi: 10.1016/s0008-6363(96)00131-9
- Varlet, I., Collignon, J., & Robertson, E. J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development*, 124(5), 1033-1044.
- Varner, V. D., & Taber, L. A. (2012). Not just inductive: a crucial mechanical role for the endoderm during heart tube assembly. *Development*, 139(9), 1680-1690. doi: 10.1242/dev.073486
- Vega-Hernandez, M., Kovacs, A., De Langhe, S., & Ornitz, D. M. (2011). FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Development*, 138(15), 3331-3340. doi: 10.1242/dev.064410
- Verheijck, E. E., van Kempen, M. J. A., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongsma, H. J., & Bouman, L. N. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovascular Research*, 52(1), 40-50. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00364-9
- Verheijck, E. E., Vanginneken, A. C. G., Bourrier, J., & Bouman, L. N. (1995). Effects of delayed rectifier currents blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. *Circulation Research*, 76(4), 607-615.
- Verheijck, E. E., Wessels, A., van Ginneken, A. C. G., Bourrier, J., Markman, M. W. M., Vermeulen, J. L. M., de Bakker, J.M.T., Lamers, W.H., Opthof, T., Bouman, L. N. (1998). Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node - Models of sinoatrial transition. *Circulation*, 97(16), 1623-1631.
- Vermot, J., Forouhar, A. S., Liebling, M., Wu, D., Plummer, D., Gharib, M., & Fraser, S. E. (2009). Reversing Blood Flows Act through *klf2a* to Ensure Normal Valvulogenesis in the Developing Heart. [Article]. *Plos Biology*, 7(11): e1000246. doi: 10.1371/journal.pbio.1000246
- Vervloessem, T., Yule, D. I., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2015). The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing  $Ca^{2+}$ -release channel. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1853(9), 1992-2005. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.006
- Verzi, M. P., McCulley, D. J., De Val, S., Dodou, E., & Black, B. L. (2005). The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. [Article]. *Developmental Biology*, 287(1), 134-145. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.041
- Vicente-Steijn, R., Kolditz, D. P., Mahtab, E. A. F., Askar, S. F. A., Bax, N. A. M., Van Der Graaf, L. M., Wisse, L. J., Passier, R., Pijnappels, D. A., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Gittenberger-De Groot, A. C. Jongbloed, M. R. M. (2010). Electrical Activation of Sinus Venosus Myocardium and Expression Patterns of RhoA and *Isl-1* in the Chick Embryo. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 21(11), 1284-1292. doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.01790.x
- Vicente-Steijn, R., Passier, R., Wisse, L. J., Schalij, M. J., Poelmann, R. E., Gittenberger-de Groot, A. C., & Jongbloed, M. R. M. (2011). Funny current channel HCN4 delineates the developing cardiac conduction system in chicken heart. *Heart Rhythm*, 8(8), 1254-1263. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.03.043
- Viebahn, C. (1999). 3 The Anterior Margin of the Mammalian Gastrula: Comparative and

- Phylogenetic Aspects of Its Role in Axis Formation and Head Induction. *Current Topics in Developmental Biology*, 46, 63-103.
- Vincenz, J. W., Firulli, B. A., Lin, A., Spicer, D. B., Howard, M. J., & Firulli, A. B. (2013). Twist1 Controls a Cell-Specification Switch Governing Cell Fate Decisions within the Cardiac Neural Crest. [Article]. *Plos Genetics*, 9(3): e1003405. doi: 10.1371/journal.pgen.1003405
- Viotti, M., Niu, L., Shi, S. H., & Hadjantonakis, A. K. (2012). Role of the Gut Endoderm in Relaying Left-Right Patterning in Mice. *Plos Biology*, 10(3): e1001276. doi: 10.1371/journal.pbio.1001276
- Viragh, S., & Challice, C. E. (1973). Origin and differentiation of cardiac muscle cells in mouse. [Article]. *Journal of Ultrastructure Research*, 42(1-2), 1-24.
- Viragh, S., & Challice, C. E. (1977). The development of the conduction system in the mouse embryo heart. 2. Histogenesis of atrioventricular node and bundle. *Developmental Biology*, 56(2), 397-411. doi: 10.1016/0012-1606(77)90279-2
- Viragh, S., & Challice, C. E. (1980). The development of the conduction system in the mouse embryo heart. 3. The development of sinus muscle and sinoatrial node. *Developmental Biology*, 80(1), 28-45. doi: 10.1016/0012-1606(80)90496-0
- Viragh, S., & Challice, C. E. (1981). The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anatomical Record*, 201(1), 157-168. doi: 10.1002/ar.1092010117
- Viragh, S., & Challice, C. E. (1982). The development of the conduction system in the mouse embryo heart. 4. Differentiation of the atrioventricular conduction system. *Developmental Biology*, 89(1), 25-40. doi: 10.1016/0012-1606(82)90290-1
- Viragh, S., Challice, C. E., & Szabo, E. (1982). Earliest evidence of cytological and electrical differentiation of heart cells in the embryo. *Journal of Cell Biology*, 95(2), A36-A36.
- Viragh, S., Szabo, E., & Challice, C. E. (1989). Formation of the primitive myocardial and endocardial tubes in the chicken embryo. [Article]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 21(2), 123-137.
- Virtanen, I., Narvanen, O., & Thornell, L. E. (1990). Monoclonal antibody to Desmin purified from cow Purkinje fibers reveals a cell type specific determinant. *Febs Letters*, 267(1), 176-178. doi: 10.1016/0014-5793(90)80317-c
- Voboril, Z., & Schiebler, T. (1969). Development of blood supply in rat heart. *Zeitschrift fur Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 129(1), 24-40. doi: 10.1007/bf00521953
- Volz, K. S., Jacobs, A. H., Chen, H. D. I., Poduri, A., McKay, A. S., Riordan, D. P., Kofler, N., Kitajewski, J., Weissmann, I., Red-Horse, K. (2015). Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle. *Elife*, 4: e10036. doi: 10.7554/eLife.10036
- von Gise, A., Zhou, B., Honor, L. B., Ma, Q., Petryk, A., & Pu, W. T. (2011). WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through beta-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Developmental Biology*, 356(2), 421-431. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.668
- Voronov, D. A., Alford, P. W., Xu, G., & Taber, L. A. (2004). The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo. [Article]. *Developmental Biology*, 272(2), 339-350. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.04.033
- Voronov, D. A., & Taber, L. A. (2002). Cardiac looping in experimental conditions: Effects of extraembryonic forces. [Article]. *Developmental Dynamics*, 224(4), 413-421. doi: 10.1002/dvdy.10121
- Vrancken Peeters, M. P., Mentink, M. M., Poelmann, R. E., & Gittenberger-de Groot, A. C. (1995). Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anatomy and Embryology*, 191(6), 503-508.
- Waldo, K., Miyagawa-Tomita, S., Kumiski, D., & Kirby, M. L. (1998). Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: Aortic sac to ventricular septal closure. *Developmental Biology*, 196(2), 129-144. doi:

10.1006/dbio.1998.8860

- Waldo, K. L., Hutson, M. R., Stadt, H. A., Zdanowicz, M., Zdanowicz, J., & Kirby, M. L. (2005a). Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. [Article]. *Developmental Biology*, 281(1), 66-77. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.011
- Waldo, K. L., Hutson, M. R., Ward, C. C., Zdanowicz, M., Stadt, H. A., Kumiski, D., Abu-Issa, R., Kirby, M. L. (2005b). Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. [Article]. *Developmental Biology*, 281(1), 78-90. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.012
- Waldo, K. L., Kumiski, D., & Kirby, M. L. (1996). Cardiac neural crest is essential for the persistence rather than the formation of an arch artery. *Developmental Dynamics*, 205(3), 281-292. doi: 10.1002/(sici)1097-0177(199603)205:3<281::aid-aja8>3.0.co;2-e
- Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., Stadt, H. A., Hutson, M. R., Platt, D. H., & Kirby, M. L. (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. [Article]. *Development*, 128(16), 3179-3188.
- Waldo, K. L., Willner, W., & Kirby, M. L. (1990). Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo. *American Journal of Anatomy*, 188(2), 109-120. doi: 10.1002/aja.1001880202
- Wang, H., She, Q., Gao, L. Z., Zha, C. Q., Du, J. L., & Jing, X. D. (2015). Tbx18 Function in The Development of Mouse Coronary Vascular and Ventricular Wall Structures. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 42(4), 348-355.
- Wang, H. U., Chen, Z. F., & Anderson, D. J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 93(5), 741-753. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81436-1
- Wang, J., Klysik, E., Sood, S., Johnson, R. L., Wehrens, X. H. T., & Martin, J. F. (2010). Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), 9753-9758. doi: 10.1073/pnas.0912585107
- Wang, J. K., Nagy, A., Larsson, J., Dudas, M., Sucov, H. M., & Kaartinen, V. (2006). Defective ALK5 signaling in the neural crest leads to increased postmigratory neural crest cell apoptosis and severe outflow tract defects. *Biomed Central Developmental Biology*, 6: 51. doi: 10.1186/1471-213x-6-51
- Wang, L., Feng, Z. P., Kondo, C. S., Sheldon, R. S., & Duff, H. J. (1996). Developmental changes in the delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in mouse heart. *Circulation Research*, 79(1), 79-85.
- Wang, S., Lakomy, D. S., Garcia, M. D., Lopez, A. L., Larin, K. V., & Larina, I. V. (2016). Four-dimensional live imaging of hemodynamics in mammalian embryonic heart with Doppler optical coherence tomography. *Journal of Biophotonics*, 9(8), 837-847. doi: 10.1002/jbpo.201500314
- Wang, X., Chen, D., Chen, K., Jubran, A., Ramirez, A., & Astrof, S. (2017). Endothelium in the pharyngeal arches 3, 4 and 6 is derived from the second heart field. *Developmental Biology*, 421(2), 108-117. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.12.010
- Ward, N. L., Van Slyke, P., Sturk, C., Cruz, M., & Dumont, D. J. (2004). Angiopoietin 1 expression levels in the myocardium direct coronary vessel development. *Developmental Dynamics*, 229(3), 500-509. doi: 10.1002/dvdy.10479
- Watanabe, M., Choudhry, A., Berlan, M., Singal, A., Siwik, E., Mohr, S., & Fisher, S. A. (1998). Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. [Article]. *Development*, 125(19), 3809-3820.
- Watanabe, M., Jafri, A., & Fisher, S. A. (2001). Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. [Article]. *Developmental Biology*,

- 240(1), 274-288. doi: 10.1006/dbio.2001.0466
- Watanabe, Y., Miyagawa-Tomita, S., Vincent, S. D., Kelly, R. G., Moon, A. M., & Buckingham, M. E. (2010). Role of Mesodermal FGF8 and FGF10 Overlaps in the Development of the Arterial Pole of the Heart and Pharyngeal Arch Arteries. [Article]. *Circulation Research*, 106(3), 495-503. doi: 10.1161/circresaha.109.201665
- Watanabe, Y., Zaffran, S., Kuroiwa, A., Higuchi, H., Ogura, T., Harvey, R. P., Kelly, R.G., Buckingham, M. (2012). Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by Tbx1, Nkx2-5, and Islet1 reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(45), 18273-18280. doi: 10.1073/pnas.1215360109
- Watson, K. M. (1924). The Origin of the Heart and Blood Vessels in *Felis Domestica*. *Journal of Anatomy*, 58(Pt 2), 105-133.
- Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J. X., & Duncan, S. A. (2004). GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12573-12578. doi: 10.1073/pnas.0400752101
- Webb, S., Brown, N., Wessels, A., & Anderson, R. H. (1998). Development of the murine pulmonary vein and its relationship to the embryonic venous sinus. *Anatomical Record*, 250(3), 325-334. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(199803)250:3<325::aid-ar7>3.0.co;2-z
- Webb, S., Brown, N. A., Anderson, R. H., & Richardson, M. K. (2000). Relationship in the chick of the developing pulmonary vein to the embryonic systemic venous sinus. *Anatomical Record*, 259(1), 67-75. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(20000501)259:1<67::aid-ar8>3.0.co;2-5
- Webb, S., Qayyum, S. R., Anderson, R. H., Lamers, W. H., & Richardson, M. K. (2003). Septation and separation within the outflow tract of the developing heart. [Review]. *Journal of Anatomy*, 202(4), 327-342.
- Webb S, K. M., Anderson RH, Richardson MK, Brown NA. (2001). Development of the human pulmonary vein and its incorporation in the morphologically left atrium. [research support]. *Cardiology of the young*, 11(6), 632-642.
- Wei, D., Bao, H., Liu, X. Y., Zhou, N., Wang, Q., Li, R. G., Xu, Y. J., Yang, Y. Q. (2013). GATA5 loss-of-Function Mutations Underlie Tetralogy of Fallot. *International Journal of Medical Sciences*, 10(1), 34-42. doi: 10.7150/ijms.5270
- Wei, D. Z., Tao, L. Y., & Huang, M. Y. (2016). Genetic variations involved in sudden cardiac death and their associations and interactions. *Heart Failure Reviews*, 21(4), 401-414. doi: 10.1007/s10741-016-9563-6
- Wei, Y., & Mikawa, T. (2000). Fate diversity of primitive streak cells during heart field formation in ovo. [Article]. *Developmental Dynamics*, 219(4), 505-513.
- Wenink, A. C. G. (1976). Development of human cardiac conducting system. *Journal of Anatomy*, 121(JUL), 617-631.
- Wescott, A. P., Jafri, M. S., Lederer, W. J., & Williams, G. S. B. (2016). Ryanodine receptor sensitivity governs the stability and synchrony of local calcium release during cardiac excitation-contraction coupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 92, 82-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.01.024>
- Wessels A, Anderson RH, Markwald RR, Webb S, Brown NA, Viragh S, Moorman, A.F.M., WH., L. (2000). Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues. [review]. *The Anatomical Record*, 259(3), 288-300.
- Wessels, A., Markman, M. W. M., Vermeulen, J. L. M., Anderson, R. H., Moorman, A. F. M., & Lamers, W. H. (1996). The development of the atrioventricular junction in the human heart. [Article]. *Circulation Research*, 78(1), 110-117.
- Wessels, A., & Perez-Pomares, J. M. (2004). The epicardium and epicardially derived cells

- (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 276A(1), 43-57. doi: 10.1002/ar.a.10129
- Wessels, A., van den Hoff, M. J. B., Adamo, R. F., Phelps, A. L., Lockhart, M. M., Sauls, K., Briggs, L.E., Norris, R.A., van Wijk, B., Perez-Pomares, J.M., Dettman, R.W., Burch, J. B. E. (2012). Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. [Article]. *Developmental Biology*, 366(2), 111-124. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.020
- Wessels, A., Vermeulen, J. L. M., Verbeek, F. J., Viragh, S., Kalman, F., Lamers, W. H., & Moorman, A. F. M. (1992). Spatial distribution of tissue specific antigens in the developing human heart and skeletal muscle. 3. an immunohistochemical analysis of the distribution of the neural tissue antigen G1N2 in the embryonic heart – implications for the development of the atrioventricular conduction system. [Article]. *Anatomical Record*, 232(1), 97-111. doi: 10.1002/ar.1092320111
- Wiencierz, A. M., Kernbach, M., Ecklebe, J., Monnerat, G., Tomiuk, S., Raulf, A., Christalla, P., Malan, D., Hesse, M., Bosio, A., Fleischmann, B.K., Eckardt, D. (2015). Differential Expression Levels of Integrin alpha 6 Enable the Selective Identification and Isolation of Atrial and Ventricular Cardiomyocytes. *PLoS One*, 10(11): e0143538. doi: 10.1371/journal.pone.0143538
- Wiese, C., Grieskamp, T., Airik, R., Mommersteeg, M. T. M., Gardiwal, A., de Gier-de Vries, C., Schuster-Gossler, K., Moorman, A.F.M., Kispert, A., Christoffels, V. M. (2009). Formation of the Sinus Node Head and Differentiation of Sinus Node Myocardium Are Independently Regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circulation Research*, 104(3), 388-397. doi: 10.1161/circresaha.108.187062
- Wikenheiser, J., Wolfram, J. A., Gargasha, M., Yang, K., Karunamuni, G., Wilson, D. L., Semenza, G.L., Agani, F., Fisher, S.A., Ward, N., Watanabe, M. (2009). Altered Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha Expression Levels Correlate with Coronary Vessel Anomalies. *Developmental Dynamics*, 238(10), 2688-2700. doi: 10.1002/dvdy.22089
- Wilson, J. G., Roth, C. B., & Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal Vitamin-A deficiency – effects of restoration of Vitamin-A at various times during gestation. [Article]. *American Journal of Anatomy*, 92(2), 189-217.
- Wilson, J. G., & Warkany, J. (1949). Aortic arch and cardiac anomalies in the offspring of Vitamin-A deficient rats. [Article]. *American Journal of Anatomy*, 85(1), 113-155.
- Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M., & Edlund, T. (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Current Biology*, 10(8), 421-429. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00431-0
- Wilting, J., Buttler, K., Schulte, I., Papoutsis, M., Schweigerer, L., & Manner, J. (2007). The proepicardium delivers hemangioblasts but not lymphangioblasts to the developing heart. *Developmental Biology*, 305(2), 451-459. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.02.026
- Wu, B. R., Baldwin, H. S., & Zhou, B. (2013a). Nfatc1 directs the endocardial progenitor cells to make heart valve primordium. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(8), 294-300. doi: 10.1016/j.tcm.2013.04.003
- Wu, B. R., Wang, Y. D., Lui, W., Langworthy, M., Tompkins, K. L., Hatzopoulos, A. K., Baldwin, H.S., Zhou, B. (2011). Nfatc1 Coordinates Valve Endocardial Cell Lineage Development Required for Heart Valve Formation. [Article]. *Circulation Research*, 109(2), 183-192. doi: 10.1161/circresaha.111.245035
- Wu, B. R., Wang, Y. D., Xiao, F., Butcher, J. T., Yutzey, K. E., & Zhou, B. (2017). Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease. *Annual Review of Physiology*, 79, 21-41.
- Wu, B. R., Zhang, Z., Lui, W., Chen, X. J., Wang, Y. D., Chamberlain, A. A., Moreno-Rodriguez, R. A., Markwald, R. R., O'Rourke, B. P., Sharp, D. J., Zheng, D. Y., Lenz, J., Baldwin, H. S., Chang, C. P., Zhou, B. (2012). Endocardial Cells Form the

- Coronary Arteries by Angiogenesis through Myocardial-Endocardial VEGF Signaling. *Cell*, 151(5), 1083-1096. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.023
- Wu, M. F., Smith, C. L., Hall, J. A., Lee, I., Luby-Phelps, K., & Tallquist, M. D. (2010). Epicardial Spindle Orientation Controls Cell Entry into the Myocardium. *Developmental Cell*, 19(1), 114-125. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.011
- Wu, S. P., Cheng, C. M., Lanz, R. B., Wang, T. N., Respress, J. L., Ather, S., Chen, W., Tsai, M.J., Tsai, S. Y. (2013b). Atrial Identity Is Determined by a COUP-TFII Regulatory Network. *Developmental Cell*, 25(4), 417-426. doi: 10.1016/j.devcel.2013.04.017
- Wu, S. P., Dong, X. R., Regan, J. N., Su, C., & Majesky, M. W. (2013c). Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels. *Developmental Biology*, 383(2), 307-320. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.08.019
- Wystrychowski, W., Patlolla, B., Yan, Z. G., Neofytou, E., Robbins, R. C., & Beygui, R. E. (2016). Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Research & Therapy*, 7: 84. doi: 10.1186/s13287-016-0343-y
- Wythe, J. D., Dang, L. T. H., Devine, W. P., Boudreau, E., Artap, S. T., He, D., Schachterle, W., Stainier, D.Y.R., Oettgen, P., Black, B.L., Bruneau, B.G., Fish, J. E. (2013). ETS Factors Regulate Vegf-Dependent Arterial Specification. *Developmental Cell*, 26(1), 45-58. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.007
- Xavier, J., Castro, R. A., Sampaio, A. C., Azambuja, A. P., Castillo, H. A., Cravo, R. M., & Simoes-Costa, M. S. (2007). Parallel avenues in the evolution of hearts and pumping organs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(6), 719-734. doi: 10.1007/s00018-007-6524-1
- Xavier-Neto, J., Neville, C. M., Shapiro, M. D., Houghton, L., Wang, G. F., Nikovits, W., Stockdale, F.E., Rosenthal, N. (1999). A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development*, 126(12), 2677-2687.
- Xavier-Neto, J., Shapiro, M. D., Houghton, L., & Rosenthal, N. (2000). Sequential Programs of Retinoic Acid Synthesis in the Myocardial and Epicardial Layers of the Developing Avian Heart [review]. *Developmental Biology*, 219(1), 129-141.
- Xie, H. P., Ye, D., Sepich, D., & Lin, F. (2016). S1pr2/G alpha(13) signaling regulates the migration of endocardial precursors by controlling endoderm convergence. *Developmental Biology*, 414(2), 228-243. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.04.021
- Xie, L. L., Hoffmann, A. D., Burnicka-Turek, O., Friedland-Little, J. M., Zhang, K., & Moskowitz, I. P. (2012). Tbx5-Hedgehog Molecular Networks Are Essential in the Second Heart Field for Atrial Septation. [Article]. *Developmental Cell*, 23(2), 280-291. doi: 10.1016/j.devcel.2012.06.006
- Xu, C., Hasan, S. S., Schmidt, I., Rocha, S. F., Pitulescu, M. E., Bussmann, J., Meyen, D., Raz, E., Adams, R.H., Siekmann, A. F. (2014). Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells. *Nature Communications*, 5: 5758. doi: 10.1038/ncomms6758
- Xu, H. S., Cerrato, F., & Baldini, A. (2005). Timed mutation and cell-fate mapping reveal reiterated roles of Tbx1 during embryogenesis, and a crucial function during segmentation of the pharyngeal system via regulation of endoderm expansion. [Article]. *Development*, 132(19), 4387-4395. doi: 10.1242/dev.02018
- Xu, J. Y., Lee, Y. K., Ran, X. R., Liao, S. Y., Yang, J., Au, K. W., Lai, W.H., Esteban, M.A., Tse, H. F. (2016). Generation of Induced Cardiospheres via Reprogramming of Skin Fibroblasts for Myocardial Regeneration. *Stem Cells*, 34(11), 2693-2706. doi: 10.1002/stem.2438
- Ya, J., Markman, M. W. M., Wagenaar, G. T. M., Blommaert, P. J. B., Moorman, A. F. M., & Lamers, W. H. (1997). Expression of the smooth-muscle proteins alpha-smooth-muscle actin and calponin, and of the intermediate filament protein desmin are parameters of cardiomyocyte maturation in the prenatal rat heart. *Anatomical Record*, 249(4), 495-505. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(199712)249:4<495::aid-ar9>3.0.co;2-q

- Ya, J., van den Hoff, M. J. B., de Boer, P. A. J., Tesink-Taekema, S., Franco, D., Moorman, A. F. M., & Lamers, W. H. (1998). Normal development of the outflow tract in the rat. [Article]. *Circulation Research*, 82(4), 464-472.
- Yalcin, H. C., Shekhar, A., McQuinn, T. C., & Butcher, J. T. (2011). Hemodynamic Patterning of the Avian Atrioventricular Valve. *Developmental Dynamics*, 240(1), 23-35. doi: 10.1002/dvdy.22512
- Yamada, M., Revelli, J. P., Eichele, G., Barron, M., & Schwartz, R. J. (2000). Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: Evidence for BMP2 induction of Tbx2. [Article]. *Developmental Biology*, 228(1), 95-105. doi: 10.1006/dbio.2000.9927
- Yamamoto, M., Beppu, H., Takaoka, K., Meno, C., Li, E., Miyazono, K., & Hamada, H. (2009). Antagonism between Smad1 and Smad2 signaling determines the site of distal visceral endoderm formation in the mouse embryo. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 323-334. doi: 10.1083/jcb.200808044
- Yan, D., & Lin, X. H. (2009). Shaping Morphogen Gradients by Proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(3): a002493. doi: 10.1101/cshperspect.a002493
- Yan, S., & Jiao, K. (2016). Functions of miRNAs during Mammalian Heart Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5): 789. doi: 10.3390/ijms17050789
- Yanagisawa, H., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Williams, S. C., Clouthier, D. E., & Yanagisawa, M. (1998). Role of endothelin-1/endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice. [Article]. *Journal of Clinical Investigation*, 102(1), 22-33. doi: 10.1172/jci2698
- Yang, X. S., Chrisman, H., & Weijer, C. J. (2008). PDGF signalling controls the migration of mesoderm cells during chick gastrulation by regulating N-cadherin expression. *Development*, 135(21), 3521-3530. doi: 10.1242/dev.023416
- Yang, X. S., Dormann, D., Munsterberg, A. E., & Weijer, C. J. (2002). Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by chemotaxis mediated by positive and negative FGF4 and FGF8. [Article]. *Developmental Cell*, 3(3), 425-437.
- Yang, Y. P., Li, H. R., Cao, X. M., Wang, Q. X., Qiao, C. J., & Ya, J. (2013). Second heart field and the development of the outflow tract in human embryonic heart. [Article]. *Development Growth & Differentiation*, 55(3), 359-367. doi: 10.1111/dgd.12050
- Yang, Y. P., Li, H. R., & Jing, Y. (2004). Septation and shortening of outflow tract in embryonic mouse heart involve changes in cardiomyocyte phenotype and alpha-SMA positive cells in the endocardium. [Article]. *Chinese Medical Journal*, 117(8), 1240-1245.
- Yanni, J., Boyett, M. R., Anderson, R. H., & Dobrzynski, H. (2009). The extent of the specialized atrioventricular ring tissues. *Heart Rhythm*, 6(5), 672-680. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.01.021
- Yashiro, K., Shiratori, H., & Hamada, H. (2007). Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature*, 450(7167), 285-289. doi: 10.1038/nature06254
- Yasui, K., Liu, W. R., Opthof, T., Kada, K., Lee, J. K., Kamiya, K., & Kodama, I. (2001). I-f current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circulation Research*, 88(5), 536-542.
- Yatskievych, T. A., Ladd, A. N., & Antin, P. B. (1997). Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: The role of the hypoblast and activin. [Article]. *Development*, 124(13), 2561-2570.
- Ye, D., Xie, H. P., Hu, B., & Lin, F. (2015). Endoderm convergence controls subduction of the myocardial precursors during heart-tube formation. *Development*, 142(17), 2928-2940. doi: 10.1242/dev.113944
- Yelbuz, T. M., Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Stadt, H. A., Wolfe, R. R., Leatherbury, L., & Kirby, M. L. (2002). Shortened Outflow Tract Leads to Altered Cardiac Looping After

- Neural Crest Ablation. *Circulation*, 106(4), 504-510. doi: 10.1161/01.cir.0000023044.44974.8a
- Yi, T. Y., Wong, J. S., Feller, E., Sink, S., Taghli-Lamalle, O., Wen, J. Y., Kim, C., Fink, N., Giles, W., Soussou, W., Chen, H. S. V. (2012). Electrophysiological Mapping of Embryonic Mouse Hearts: Mechanisms for Developmental Pacemaker Switch and Internodal Conduction Pathway. [Article]. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 23(3), 309-318. doi: 10.1111/j.1540-8167.2011.02191.x
- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I. Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J. A., Sasaki, H., Nakai, J., Dworniczak, B., Ehrlich, B. E., Pennekamp, P., Hamada, H. (2012). Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via Pkd2. *Science*, 338(6104), 226-231. doi: 10.1126/science.1222538
- You, L. R., Lin, F. J., Lee, C. T., DeMayo, F. J., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2005). Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*, 435(7038), 98-104. doi: 10.1038/nature03511
- Yu, H. M., Smallwood, P. M., Wang, Y. S., Vidaltamayo, R., Reed, R., & Nathans, J. (2010). Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes. *Development*, 137(21), 3707-3717. doi: 10.1242/dev.052001
- Yuan, H. T., Khankin, E. V., Karumanchi, S. A., & Parikh, S. M. (2009). Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), 2011-2022. doi: 10.1128/mcb.01472-08
- Yuasa, S., Itabashi, Y., Koshimizu, U., Tanaka, T., Sugimura, K., Kinoshita, M., Hattori, F., Fukami, S., Shimazaki, T., Okano, H., Ogawa, S., Fukuda, K. (2005). Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23(5), 607-611. doi: 10.1038/nbt1093
- Yue, Q., Wagstaff, L., Yang, X., Weijer, C., & Munsterberg, A. (2008). Wnt3a-mediated chemorepulsion controls movement patterns of cardiac progenitors and requires RhoA function. *Development*, 135(6), 1029-1037. doi: 10.1242/dev.015321
- Yutzey, K. E., Rhee, J. T., & Bader, D. (1994). Expression of the atrial-specific myosin heavy-chain Amhc1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. [Article]. *Development*, 120(4), 871-883.
- Zaffran, S., & Frasch, M. (2002). Early signals in cardiac development. *Circulation Research*, 91(6), 457-469. doi: 10.1161/01.res.0000034152.74523.a8
- Zaffran, S., Kelly, R. G., Meilhac, S. N. M., Buckingham, M. E., & Brown, N. A. (2004). Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circulation Research*, 95(3), 261-268. doi: 10.1161/01.res.0000136815.73623.be
- Zahler, R., Brines, M., Gilmorehebert, M., Kashgarian, M., & Benz, E. J. (1992). Cellular patterns of Na,K-ATPase alpha-isoform expression in rat vascular and cardiac tissue. *Clinical Research*, 40(2), A154-A154.
- Zamir, E. A., Srinivasan, V., Perucchio, R., & Taber, L. A. (2003). Mechanical asymmetry in the embryonic chick heart during looping. *Annals of Biomedical Engineering*, 31(11), 1327-1336. doi: 10.1114/1.1623487
- Zamir, L., Singh, R., Nathan, E., Patrick, R., Yifa, O., Yahalom-Ronen, Y., Arrafi, A. A., Schultheiss, T. M., Suo, S. B., Han, J. D. J., Peng, G. D., Jing, N., Wang, Y. L., Palpant, N., Tam, P. P. L., Harvey, R. P., Tzahor, E. (2017). Nkx2.5 marks angioblasts that contribute to hemogenic endothelium of the endocardium and dorsal aorta. *Elife*, 6: e20994. doi: 10.7554/eLife.20994
- Zamora, M., Manner, J., & Ruiz-Lozano, P. (2007). Epicardium-derived progenitor cells require ss-catenin for coronary artery formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 18109-18114. doi:

10.1073/pnas.0702415104

- Zeller, R., Bloch, K. D., Williams, B. S., Arceci, R. J., & Seidman, C. E. (1987). Localized expression of the Atrial-Natriuretic-Factor gene during cardiac embryogenesis. [Article]. *Genes & Development*, *1*(7), 693-698. doi: 10.1101/gad.1.7.693
- Zhang, H., Pu, W. J., Li, G., Huang, X. Z., He, L. J., Tian, X. Y., Lu, Q.Z., Zhang, L.B., Wu, S.M., Sucov, H.M., Zhou, B. (2016). Endocardium Minimally Contributes to Coronary Endothelium in the Embryonic Ventricular Free Walls. *Circulation Research*, *118*(12), 1880-1893. doi: 10.1161/circresaha.116.308749
- Zhang, H., von Gise, A., Liu, Q. Z., Hu, T. Y., Tian, X. Y., He, L. J., Pu, W.J., Huang, X.Z., He, L., Cai, C.L., Camargo, F.D., Pu, W.T., Zhou, B. (2014). Yap1 Is Required for Endothelial to Mesenchymal Transition of the Atrioventricular Cushion. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(27), 18681-18692. doi: 10.1074/jbc.M114.554584
- Zhang, H. B., & Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion chorion and cardiac development. [Article]. *Development*, *122*(10), 2977-2986.
- Zhang, J., Chang, J. Y. F., Huang, Y. Q., Lin, X. A., Luo, Y. D., Schwartz, R. J., Martin, J.F., Wang, F. (2010). The FGF-BMP Signaling Axis Regulates Outflow Tract Valve Primordium Formation by Promoting Cushion Neural Crest Cell Differentiation. [Article]. *Circulation Research*, *107*(10), 1209-1219. doi: 10.1161/circresaha.110.225318
- Zhang, J., Liu, J. C., Liu, L. Y., McKeenan, W. L., & Wang, F. (2012a). The fibroblast growth factor signaling axis controls cardiac stem cell differentiation through regulating autophagy. [Editorial Material]. *Autophagy*, *8*(4), 690-691. doi: 10.4161/auto.19290
- Zhang, S. S., Kim, K. H., Rosen, A., Smyth, J. W., Sakuma, R., Delgado-Olguin, P., Davis, M., Chi, N. C., Puviondran, V., Gaborit, N., Sukonnik, T., Wylie, J. N., Brand-Arzamendi, K., Farman, G. P., Kim, J., Rose, R. A., Marsden, P. A., Zhu, Y. H., Zhou, Y. Q., Miquerol, L., Henkelman, R. M., Stainier, D. Y. R., Shaw, R. M., Hui, C. C., Bruneau, B. G., Backx, P. H. (2011a). Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(33), 13576-13581. doi: 10.1073/pnas.1106911108
- Zhang, W. J., Chen, H. Y., Wang, Y., Yong, W. D., Zhu, W. Q., Liu, Y. L., Wagner, G.R., Payne, R.M., Field, L.J., Xin, H.B., Cai, C.L., Shou, W. N. (2011b). Tbx20 Transcription Factor Is a Downstream Mediator for Bone Morphogenetic Protein-10 in Regulating Cardiac Ventricular Wall Development and Function. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(42), 36820-36829. doi: 10.1074/jbc.M111.279679
- Zhang, X., Guo, J. P., Chi, Y. L., Liu, Y. C., Zhang, C. S., Yang, X. Q., Lin, H.Y., Jang, E.P., Xiong, S.H., Zhang, Z.Y., Liu, B. H. (2012b). Endothelin-induced differentiation of Nkx2.5(+) cardiac progenitor cells into pacemaking cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *366*(1-2), 309-318. doi: 10.1007/s11010-012-1309-8
- Zhang, Z., Cerrato, F., Xu, H. S., Vitelli, F., Morishima, M., Vincentz, J., Furuta, Y., Ma, L.J., Martin, J.F., Baldini, A., Lindsay, E. (2005). Tbx1 expression in pharyngeal epithelia is necessary for pharyngeal arch artery development. [Article]. *Development*, *132*(23), 5307-5315. doi: 10.1242/dev.02086
- Zhang, Z., & Zhou, B. (2013). Accelerated Coronary Angiogenesis by Vegfr1-Knockout Endocardial Cells. *PLoS One*, *8*(7): e70570. doi: 10.1371/journal.pone.0070570
- Zhao, B., Etter, L., Hinton, R. B., & Benson, D. W. (2007a). BMP and FGF regulatory pathways in semilunar valve precursor cells. [Article]. *Developmental Dynamics*, *236*(4), 971-980. doi: 10.1002/dvdy.21097
- Zhao, C. M., Peng, L. Y., Li, L., Liu, X. Y., Wang, J., Zhang, X. L., Yuan, F., Li, R.G., Qiu, X.B., Yang, Y. Q. (2015). PITX2 Loss-of-Function Mutation Contributes to

- Congenital Endocardial Cushion Defect and Axenfeld-Rieger Syndrome. *PLoS One*, 10(4): e0124409. doi: 10.1371/journal.pone.0124409
- Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., Srivastava, D. (2007b). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129(2), 303-317. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.030
- Zhao, Y., Samal, E., & Srivastava, D. (2005). Serum, response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436(7048), 214-220
- Zhao, Y. T., Du, J. F., Chen, Y. F., Tang, Y. L., Qin, G. J., Lv, G. R., Zhuang, S.G., Zhao, T. C. (2015). Inhibition of Oct 3/4 mitigates the cardiac progenitor-derived myocardial repair in infarcted myocardium. *Stem Cell Research & Therapy*, 6: 259. doi: 10.1186/s13287-015-0252-5
- Zhou, B., Honor, L. B., He, H. M., Ma, Q., Oh, J. H., Butterfield, C., Lin, R. Z., Melero-Martin, J. M., Dolmatova, E., Duffy, H. S., von Gise, A., Zhou, P. Z., Hu, Y. W., Wang, G., Zhang, B., Wang, L. C., Hall, J. L., Moses, M. A., McGowan, F. X., Pu, W. T. (2011). Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1894-1904. doi: 10.1172/jci45529
- Zhou, B., Ma, Q., Kong, S. W., Hu, Y. W., Campbell, P. H., McGowan, F. X., Ackermann, K.G., Wu, B.R., Tevosian, S.G., Pu, W. T. (2009). Fog2 is critical for cardiac function and maintenance of coronary vasculature in the adult mouse heart. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1462-1476. doi: 10.1172/jci38723
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S. M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D.W., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R., Pu, W. T. (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. [Article]. *Nature*, 454(7200), 109-113. doi: 10.1038/nature07060
- Zhou, B., von Gise, A., Ma, Q., Hu, Y. W., & Pu, W. T. (2010). Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosis of the mammalian heart. *Developmental Biology*, 338(2), 251-261. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.007>
- Zhou, B., Wu, B. R., Tompkins, K. L., Boyer, K. L., Grindley, J. C., & Baldwin, H. S. (2005). Characterization of Nfatc1 regulation identifies an enhancer required for gene expression that is specific to pro-valve endocardial cells in the developing heart. *Development*, 132(5), 1137-1146. doi: 10.1242/dev.01640
- Zhou, L., Liu, J., Xiang, M., Olson, P., Guzzetta, A., Zhang, K., Moskowitz, I.P., Xie, L. (2017). Gata4 potentiates second heart field proliferation and Hedgehog signaling for cardiac septation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(8), E1422-E1431. doi: 10.1073/pnas.1605137114
- Zhou, Z. N., Rawnsley, D. R., Goddard, L. M., Pan, W., Cao, X. J., Jakus, Z., Zheng, H., Yang, J. S., Arthur, J. S. C., Whitehead, K. J., Li, D. A., Zhou, B., Garcia, B. A., Zheng, X. J., Kahn, M. L. (2015). The Cerebral Cavernous Malformation Pathway Controls Cardiac Development via Regulation of Endocardial MEKK3 Signaling and KLF Expression. *Developmental Cell*, 32(2), 168-180. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.009

## **9. Publikationsliste**

„Neue Erkenntnisse der veterinärmedizinischen Embryologie zur Entwicklung des Herz-Kreislauf-Apparats“; 5. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar “Biomedical Sciences”, Berlin, 02.07.2010

„Development of the cardiovascular system: a review of recent literature of veterinary embryology“; 9. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar “Biomedical Sciences”, Berlin, 16.09.2016

„Novel insights into cardiogenesis - a literature-based study“; 10. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar “Biomedical Sciences”, Berlin, 22.09.2017

## **10. Danksagung**

An dieser Stelle gebührt mein größter Dank Frau Prof. Dr. Johanna Plendl, die mir diese Literaturarbeit überlassen hat, für die stete Unterstützung, die umgehende Beantwortung meiner Fragen, die rasche Lösung von Problemen, vor allem aber für ihr Lob, ihre Ermutigungen, ihre Geduld und ihr Vertrauen in mich.

Großer Dank gilt auch Frau Dr. Hana Hünigen für die Unterstützung bei der Korrektur meiner Arbeit, die konstruktive Kritik sowie die vielen ermutigenden Worte.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Simone Oberg für die arbeits- und zeitaufwändige Digitalisierung und Bearbeitung meiner von Hand gefertigten Zeichnungen sowie die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit.

Zuletzt bedanke ich mich bei allen „alten“ und „neuen“ Freunden, die mich in diesem Lebensabschnitt begleitet und mir mit mentaler, technischer oder organisatorischer Unterstützung zur Seite gestanden haben.

## **11. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ellingstedt, den 11.12.2017

Katrin Borasch