

# **Funktionelle Charakterisierung von Plakophilin-2 und Desmoplakin im adulten Mausherz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Robert Zinke

aus Berlin

Berlin, 2013

aus dem Max-Delbrück-Centrum, Berlin

Angefertigt unter der Betreuung von Dr. Arnd Heuser

Juli 2007 bis Juni 2013.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ludwig Thierfelder, Max-Delbrück-Centrum, Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Koch, Freie Universität Berlin

Disputation am: 11. November 2013

## Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Frau Maraike, die immer für mich da war und deren Liebe mir Alles bedeutet. Ihr und meiner Tochter Clara ist diese Arbeit gewidmet.

Ein großer Dank gebührt meiner Familie, im Besonderen meiner Mutter, Ernst und meinen Schwiegereltern Heidrun und Dietmar, die mich während des Studiums und der Promotion immer mit ganzer Kraft unterstützt haben.

Den wichtigsten Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte mein Betreuer Dr. Arnd Heuser, der mich über all die Jahre großartig angeleitet, motiviert und gefördert hat. Vielen herzlichen Dank.

Bei Prof. Dr. Thierfelder bedanke ich mich für die Überlassung dieses faszinierenden Promotionsthemas, seinem wissenschaftlichen Rat und für die Möglichkeit, an zahlreichen Kongressen und Kursen teilzunehmen.

Besonders wichtig für mich - und dafür bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Thierfelder - war die freundschaftliche Atmosphäre im Labor. Alle zeigten sich sowohl bei Fragestellungen im Labor als auch im wissenschaftlichen Diskurs stets hilfsbereit. Mein Dank gilt im Besonderen für die technische Hilfe in alphabetischer Reihenfolge: Carolin, Christin, Constanze, Egon, Frieda, Maik, Martin, Marie, Patrick und Steffi. Eine große Hilfe bei der Lösung wissenschaftlicher Probleme waren Brenda, Florian B., Jörg und Sabine. Danke! Für alles im und um den Laboralltag Wichtige, und vor allem für das Gefühl nicht ganz auf sich allein gestellt zu sein, bedanke ich mich bei meinen Doktorandenkollegen Florian K., Manuela, Maria, Timm und Ute.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Boris Jerchow (TCF-MDC), Dr. Clemens Köhncke, Dr. Bettina Purfürst (Elektronenmikroskopie) und Dr. Anje Sporbert (Konfokale Mikroskopie) danke ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Ursula Koch (FU-Berlin) danke ich für die für die universitäre Betreuung meiner Dissertation und die Übernahme des Gutachtens.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Die Extrazelluläre Matrix und die Zell-Matrix Adhäsion</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Zell-Zell-Adhäsion</b>	<b>5</b>
1.2.1. Barrierenkontakte, auch Verschließende Verbindungen	5
1.2.2. Kommunizierende Verbindungen, auch Kommunikationskontakte	5
1.2.3. Haftende Verbindungen, auch Adhäsions-Verbindungen	6
<b>1.3. Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten</b>	<b>8</b>
1.3.1. Die Desmosomalen Cadherine Desmoglein-2 und Desmocollin-2	11
1.3.2. Armadilloproteine	11
1.3.3. Desmoplakin	13
<b>1.4. Mausmodelle der herzspezifischen desmosomalen Proteine</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Desmosomal bedingte Erkrankungen</b>	<b>15</b>
<b>1.6. Zielstellung</b>	<b>21</b>
<b>2. ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Erzeugung von Plakophilin-2-defizienten Mauslinien</b>	<b>22</b>
2.1.1. Konstruktion des cPkp2-Targeting-Vektors	22
2.1.2. Analyse der transfizierten embryonalen Stammzellen	22
2.1.3. Generierung der konditionellen Pkp2-Knockout-Maus	23
<b>2.2. Die Bedeutung von Plakophilin-2 für die embryonale Entwicklung</b>	<b>24</b>
2.2.1. Embryonale Letalität nach ubiquitärer Deletion von Plakophilin-2	24
2.2.2. Herzspezifische Deletion von Plakophilin-2 führt zur embryonalen Letalität	25
<b>2.3. Plakophilin-2 ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Funktion des adulten Mausherzens</b>	<b>26</b>
2.3.1. Ablation von Plakophilin-2 führt zur progressiven Herzinsuffizienz	26
2.3.2. Plakophilin-2 defiziente Mäuse zeigen Anzeichen für Myokardschäden, linksventrikuläre Hypertrophie, gesteigerte Fibrose und Aktivierung des fetalen Genprogramms	28
<b>2.4. Der kanonische Wnt-Signalweg ist nicht verändert</b>	<b>31</b>
<b>2.5. Desmosomale Desintegration in Plakophilin-2 defizienten Mausherzen</b>	<b>32</b>
2.5.1. Plakophilin-2 wird effizient deletiert und resultiert nicht in einer kompensatorischen Expression von Plakophilin-1 oder -3	33
2.5.2. Die Expression der desmosomalen Proteine Plakoglobin, Desmoglein-2 und Desmocollin-2 ist reduziert	33

---

2.5.3.	Desmoglein-2 lokalisiert nicht an die Glanzstreifen Pkp2-defizienter Herzen	34
2.5.4.	Der Knockout von Plakophilin-2 führt zu einer verminderten Desmosomenzahl	34
2.5.5.	Gap-Junctions und Adhärenz-Verbindungen sind in Pkp2-Knockout-Mäusen nicht verändert	35
<b>2.6.</b>	<b>Plakophilin-2-defiziente Kardiomyozyten zeigen eine Veränderung der Intermediärfilamente, des Aktin- sowie des mikrotubulären Zytoskeletts und eine Beeinträchtigung lateraler Zelladhäsionsstrukturen</b>	<b>35</b>
<b>2.7.</b>	<b>Plakophilin-2 Deletion führt zur Aktivierung kardialer Schutzmechanismen</b>	<b>37</b>
2.7.1.	In Plakophilin-2-defizienten Herzen ist der Ilk/Akt-Signalweg aktiviert	37
2.7.2.	Erhöhte Expression von protektiven Hitzeschockproteinen in Plakophilin-2-defizienten Herzen	38
2.7.3.	Plakophilin-2-Ablation führt zur Aktivierung der Membranreparatur	39
<b>2.8.</b>	<b>Deletion von Plakophilin-2 führt zum Verlust der Membranintegrität</b>	<b>39</b>
<b>2.9.</b>	<b>Der Phänotyp von Desmoplakin-defizienten Mauserherzen zeigt Übereinstimmungen mit denen der kardial-deletierten Plakophilin-2-Mäuse</b>	<b>41</b>
2.9.1.	Ablation von Desmoplakin führt zur progressiven Herzinsuffizienz	42
2.9.2.	Keine Veränderung des kanonischen $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalwegs und desmosomale Desintegration	44
2.9.3.	Modifikation des Zytoskeletts, Internalisierung von Gap-Junctions und Störung lateraler Zelladhäsionsstrukturen	45
2.9.4.	Aktivierung kardialer Schutzmechanismen und Verlust der Membranintegrität	47
<b>2.10.</b>	<b>Der Knockout des Membranreparaturproteins Dysferlin reduziert die Lebenserwartung Desmoplakin-defizienter Mäuse</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>53</b>
<b>3.1.</b>	<b>Kardial exprimiertes Plakophilin-2 ist essenziell für die embryonale Herzentwicklung</b>	<b>53</b>
<b>3.2.</b>	<b>Plakophilin-2 und Desmoplakin sind essenziell für die adulte Herzfunktion</b>	<b>53</b>
<b>3.3.</b>	<b>Der Wnt/<math>\beta</math>-Catenin-Signalweg ist in den Pkp2- und Dsp-defizienten Mäusen nicht verändert</b>	<b>54</b>
<b>3.4.</b>	<b>Desintegration der Desmosomen</b>	<b>55</b>
<b>3.5.</b>	<b>Verlust der Desminbindung und Überexpression nicht-sarkomerer Zytoskelettproteine</b>	<b>56</b>
<b>3.6.</b>	<b>Aktivierung kardialer Schutzmechanismen</b>	<b>57</b>
<b>3.7.</b>	<b>Aktivierung der Membranreparaturmechanismen und Verlust der Membranintegrität</b>	<b>58</b>
<b>3.8.</b>	<b>Schlussfolgerung und Relevanz dieser Arbeit für die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie</b>	<b>60</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>62</b>
<b>4.1.</b>	<b>Materialien</b>	<b>62</b>
4.1.1.	Materialien und Geräte	62

---

4.1.2.	Chemikalien und Größenstandards	64
4.1.3.	Puffer und Lösungen	68
4.1.4.	Kits	70
4.1.5.	Antikörper	71
4.1.6.	Primer zur Genotypisierung und zur quantitativen real-time PCR	72
4.1.7.	Computersoftware	75
<b>4.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>76</b>
4.2.1.	Generierung des cPkp2-Mausstammes	76
4.2.2.	Tierversuche und funktionelle Untersuchungen	78
4.2.3.	Molekularbiologische Techniken	82
4.2.4.	Statistik	93
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>

## 1. Einleitung

In allen multizellulären Organismen stellt die Zell-Adhäsion eine wesentliche Grundvoraussetzung für die Entstehung von übergeordneten Strukturen wie Geweben und Organen dar. Der menschliche Körper



**Abbildung 1: Zell-Kontakte.**  
Zell-Zell- Adhäsion (rot) und  
Zell-Matrix Adhäsionen (grün).

besteht aus  $10^{13}$  Zellen, die mehr als 200 unterschiedlichen Zelltypen zugeordnet werden können. Um richtig zu funktionieren, müssen die Zellen zwei Anforderungen erfüllen, die sich auf den ersten Blick zu widersprechen scheinen: Zum einen müssen Zellen aneinander haften, um organisierte und spezialisierte Funktionseinheiten bilden zu können. Auf der anderen Seite müssen sich die Zellen aber auch voneinander lösen und umorganisieren können, um zum Beispiel Wachstum zu ermöglichen, auf Verletzungen zu reagieren oder einen Krankheitserreger abzuwehren. Ermöglicht werden diese Funktionen in tierischen Organismen durch den Aufbau spezifischer, hochkomplexer Strukturen mit denen sich die Zellen in ihrer Umgebung verankern. Diese Adhäsionsstrukturen (Abb.1) verbinden die Zellen sowohl mit der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix Adhäsion) als auch mit benachbarten Zellen (Zell-Zell Adhäsion).

### 1.1. Die Extrazelluläre Matrix und die Zell-Matrix Adhäsion

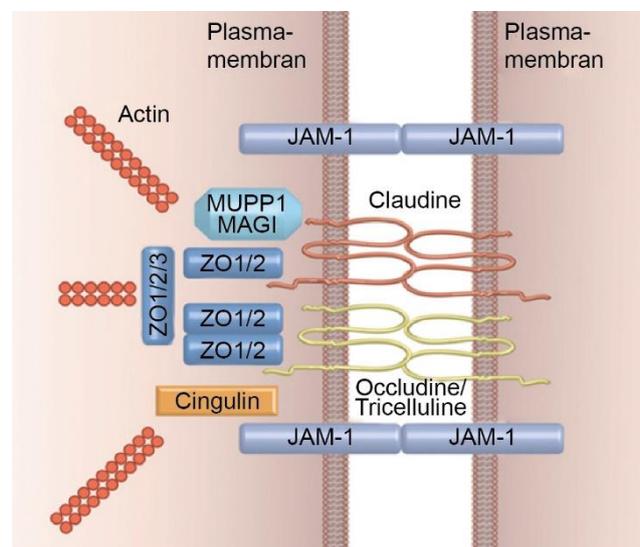
Die extrazelluläre Matrix (Interzellulärsubstanz, ECM) ist der zellfreie Anteil des Gewebes, der außerhalb der Zellen im Interzellularräum liegt. Die ECM setzt sich aus diversen Komponenten zusammen (z.B. Kollagen, Fibrillin, Eleastin, Laminin und Fibronectin). Die ECM kann je nach Gewebe unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Die höchste Festigkeit erreicht die ECM z.B. in Stützgeweben wie Knochen und Knorpel. Auf der anderen Seite kann die ECM in Bindegeweben besonders flexible und elastische Matrixstrukturen ausbilden. Zell-Matrix-Kontakte verbinden das intrazelluläre Aktin-Zytoskelett mit den ECM-Bestandteilen. Hauptsächlich werden ECM-Proteine, wie Fibronectin, Kollagen und Laminin, über transmembrane Integrine gebunden. Integrine sind aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzte Heterodimere, deren Isoformen sich in ihrer Bindungsaffinität zu den ECM-Proteinen unterscheiden. An diese Zell-Matrix-Komplexe binden intrazellulär Adapterproteine (z.B. Talin,  $\alpha$ -Aktinin, Vinculin und Filamin), die mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind. Zell-Matrix-Kontakte sind nicht ausschließlich an der Verankerung der Zelle beteiligt, sondern dienen auch als Rezeptoren für mechanische Signale. Änderungen zwischen den Bindungen von Integrinen und ECM-Proteinen können intra- und extrazelluläre Signalkaskaden aktivieren (Harburger and Calderwood, 2009).

## 1.2. Zell-Zell-Adhäsion

Als Zell-Zell-Kontakte (engl. Cell junctions) werden die direkten Berührungsstellen von Zellen in Gewebe bezeichnet. Ihnen wird die Aufgabe zugeschrieben, die Gewebe zusammenzuhalten und die Kommunikation von Zellen zu ermöglichen. Die Zell-Zell-Verbindungen können nach deren Funktion in drei große Gruppen unterteilt werden: Barriere-, Kommunikations- und Adhärenzkontakte.

### 1.2.1. Barrierekontakte, auch Verschließende Verbindungen (engl.: Occluding junctions bzw. Tight junctions)

Barrierekontakte bilden einen undurchlässigen Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellmembranen. Die am häufigsten vorkommenden Vertreter dieser Gruppe sind die Tight-Junctions (Zonula occludens). Sie formen in Epi- und Endothelien ein dichtes, die gesamte Zelle umschließendes Netzwerk. Dadurch können apikale intramembranöse Barrieren aufgebaut werden, die die freie Diffusion von Ionen und Molekülen durch die Zellzwischenräume verhindern. Die wichtigsten bisher bekannten Membranproteine der Tight Junctions sind das Occludin und die Familie der Claudine. Intrazellulär sind Tight-Junctions mit Linkerproteinen (z.B. Zonula-Occludens-Protein 1-3, Cingulin, Membran-Assoziierte-Guanylat-Kinase und Multiple-PDZ-Domänen-Protein-1) assoziiert (Abb. 2), die die Verbindung zum Aktin-



**Abbildung 2: Tight-Junction.** Schematische Darstellung von Tight-Junctions modifiziert nach (Niessen, 2007): Junctional-Adhäsions-Molekül-1 (JAM-1), Membran-Assoziierte-Guanylat-Kinase (MAGI), Multiple-PDZ-Domänen-Protein-1 (MUPP1) und Zonula-Occludens-1, -2 und -3 (ZO1, ZO2 und ZO3).

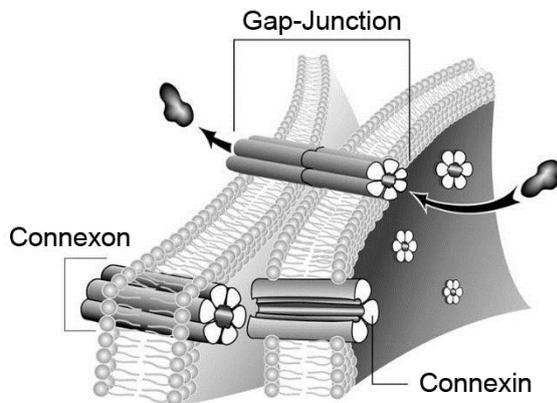
Zytoskelett ermöglichen (Balda and Matter, 2008; Niessen, 2007).

### 1.2.2. Kommunizierende Verbindungen, auch Kommunikationskontakte (engl.: Communicating junctions)

Kommunikationskontakte ermöglichen den Austausch von chemischen und elektrischen Signalen zwischen Zellen. In Vertebraten unterscheidet man dabei zwischen Synapsen und Gap-Junctions. Synapsen sind hochkomplexe Kontakte zwischen Neuronen und anderen Zellen. Sie dienen der

Übertragung und Modulation von Signalen. Außerdem sind sie in der Lage Informationen zu speichern. Bei diesen Verbindungen spielen direkte Zell-Zell-Verbindungen nur eine untergeordnete Rolle.

In Gap-Junctions bilden Adhäsionsproteine zwei miteinander verbundene Zellkanäle, sogenannte



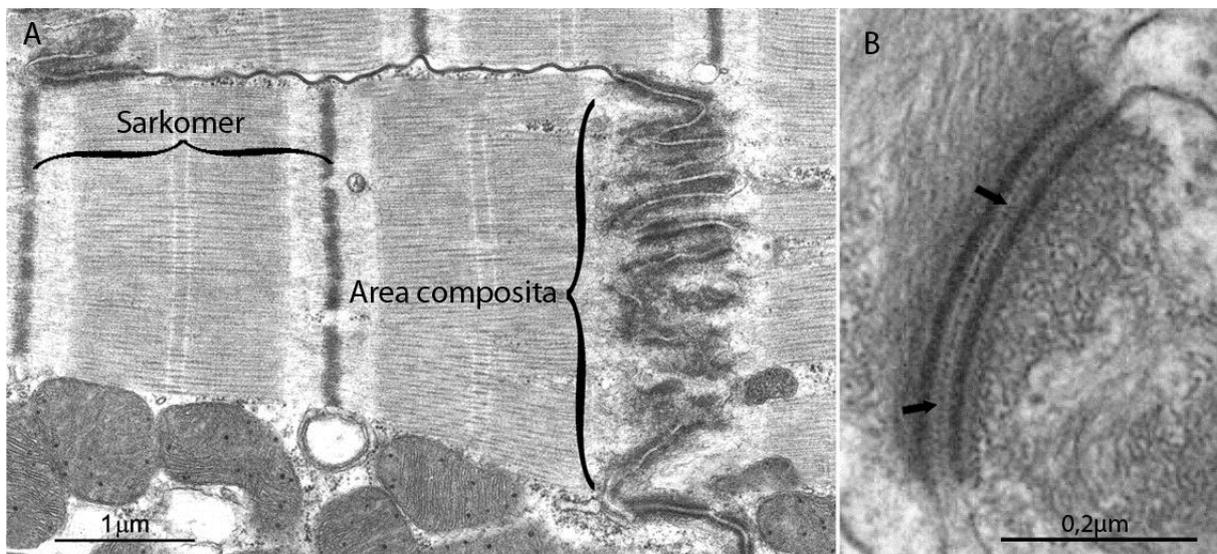
**Abbildung 3: Gap-Junction.** Schematische Darstellung von Gap-Junctions, modifiziert nach „Molecular Pathogenesis of Cholestasis“ (©Kluwer Academic 2003).

Konnexone, aus und überbrücken so den interzellulären Spalt (engl.: Gap). So ermöglichen sie den direkten Austausch von Molekülen und Ionen bis zu einer molekularen Masse von 1000 Dalton (Abb.3). Die Kommunikation über Gap-Junctions ist in nicht-vascularisierten Geweben sowohl für die Synchronisation, die Differenzierung als auch die metabolische Koordination der Zellen essenziell. Gebildet wird ein Zellkanal aus zwei entweder gleichartigen oder unterschiedlichen Connexonen. In jeder Körperzelle wird mindestens eine Connexin-Isoform exprimiert (Mese et al., 2007).

### 1.2.3. Haftende Verbindungen, auch Adhäsions-Verbindungen (engl.: Adhering junctions) Adhäsionskontakte oder Ankerverbindungen (engl.: Anchoring junctions)

Die mechanische Verankerung von Zellen untereinander erfolgt über sogenannte Adhäsionskontakte. Diese können funktionell in zwei Gruppen, die Adhärenz-Verbindungen (AJs) und Desmosomen, eingeteilt werden (Abb.4A). Die AJs bilden zellmembranöse Verankerungspunkte für das intrazelluläre Aktinzytoskelett. Kernkomponente jeder AJ sind auf molekularer Ebene die klassischen Cadherine. Die Cadherin-Familie wird aufgrund der strukturellen und funktionellen Unterschiede ihrer Mitglieder in zwei Typen (Typ-I & II) unterteilt. Typ-I Cadherine wie z.B. das epitheliale E-Cadherin oder das neurale N-Cadherin können sowohl an homotypischen, als auch an heterotypischen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sein. Zu den nahe verwandten atypischen oder Typ-II Cadherinen zählen z.B. VE-Cadherin und Cadherin-11 (Angst et al., 2001). Cadherine besitzen stark konservierte zytoplasmatische Domänen, die an Armadillo-Proteine binden, die ihrerseits die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen (Cowin et al., 1986; Nagafuchi and Takeichi, 1989). Zur Protein-Familie der Armadillo-Proteine gehören u.a.  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin, die Proteine p120ctn, ARVCF und p0071 sowie Neurojungen und die Plakophiline 1-3. Das gemeinsame Strukturmerkmal dieser Multigen-Familie bildet ein gemeinsames nach dem Segment-Polaritätsgen *Armadillo* aus *Drosophila melanogaster* (Franke et al., 1989; Peifer and Wieschaus, 1990) benanntes Motiv mit einer Bindungsstelle für Cadherine (Behrens et al., 1996; Paffenholz and Franke, 1997; Pai et al., 1996; Troyanovsky et al., 1989).

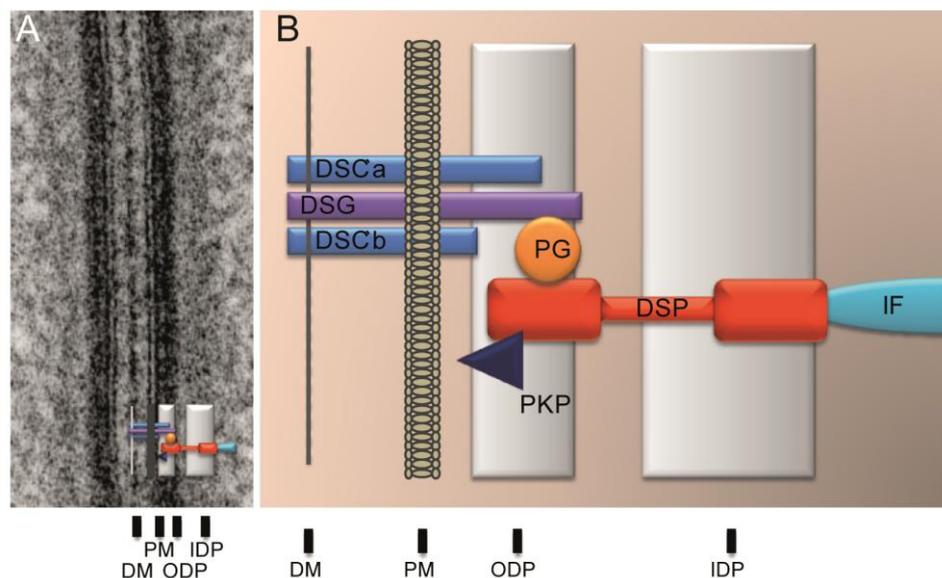
Während AJs in vielen Zelltypen verbreitet sind, kommen Desmosomen (griechisch: *desmos* = Verbindung; *soma* = Körper) gehäuft in Geweben mit starker mechanischer Beanspruchung vor, wie zum Beispiel der Haut und dem Herz. Daher nimmt man an, dass Desmosomen besonders belastbare Zell-Zell-Kontakte ausbilden, um die strukturelle Integrität der Gewebeverbände zu gewährleisten. Desmosomen sind Verankerungspunkte für das zytoskelettale Intermediärfilamentsystem, dass in der Haut hauptsächlich aus Keratin und im Herz aus Desmin besteht (Green and Gaudry, 2000; Severs et al., 2008). Für Desmosomen charakteristisch ist die symmetrische Anordnung extra- und intrazellulärer (je 15-20nm) elektronendichter Plaques an der Membran benachbarter Zellen (Abb.4B).



**Abbildung 4: Adhäsionskontakte. (A)** Elektronenmikroskopischer Ausschnitt eines Kardiomyozyten. In der Area composita liegen die Adhärenz-Verbindungsproteine und desmosomalen Proteine in einer gemischten Anordnung vor; modifiziert nach (Severs et al., 2008). **(B)** Elektronenmikroskopie eines Desmosoms mit typischer elektronendichten Mittellinie (Pfeil); modifiziert nach (Green et al., 2000).

Der durchschnittlich 30nm große Abstand zwischen den Desmosomen wird zumeist durch eine dichte Mittellinie separiert. Molekular setzen sich Desmosomen hauptsächlich aus fünf Komponenten zusammen: den desmosomalen Cadherinen Desmoglein (DSG) und Desmocollin (DSC), den Armadilloproteinen Plakophilin (PKP) und Plakoglobin (PG) sowie Desmoplakin (DSP) aus der Plakin-Familie (Thomason et al., 2010). Die zelluläre Adhäsion wird über homo- und heterophile Verbindungen der desmosomalen Cadherin gewährleistet (Syed et al., 2002). An deren intrazellulären Domänen sind die Armadilloproteine PKP und PG gebunden (Hatzfeld et al., 2000; Troyanovsky et al., 1993), die ein weitreichendes Netzwerk ausbilden und dadurch die strukturelle Integrität der Desmosomen aufrecht erhalten (Dubash and Green, 2011). Über dieses Netzwerk erfolgt die Verknüpfung von DSP, dass über die drei C-terminalen, homologen Plakin-Repeat-Domänen die Intermediärfilamente (IF) ans Desmosom verankert (Abb.5) (Delva et al., 2009; Getsios et al., 2004; O'Keefe et al., 1989). Während von PG und DSP bisher keine weiteren Isoformen in Desmosomen detektiert wurden, existieren im Menschen drei DSC-, vier DSG- und drei PKP-Isoformen (Green and Simpson, 2007). Interessanterweise weisen Mäuse sechs Dsgs auf (Whitlock, 2003). Die Plakophiline als auch die

desmosomalen Cadherine zeigen eine Differenzierungs- und Gewebe-spezifische Expressionsverteilung, was auf eine unterschiedliche Funktion der Desmosomen in den verschiedenen Geweben hindeutet (Holthofer et al., 2007). Über das genaue Verständnis der Funktion der Desmosomen existieren jedoch enorme Wissenslücken (Thomason et al., 2010). Die Bedeutung der Desmosomen für die Gewebeintegrität mechanisch stark beanspruchter Organe scheint im Herzen besonders hoch zu sein. Kardiomyozyten haben nur eine geringe regenerative Kapazität. Somit müssen Desmosomen im Menschen bei einem durchschnittlichen Puls von 80 Schlägen/min die Zugkräfte von über 42Mio Kontraktionen pro Jahr kompensieren.



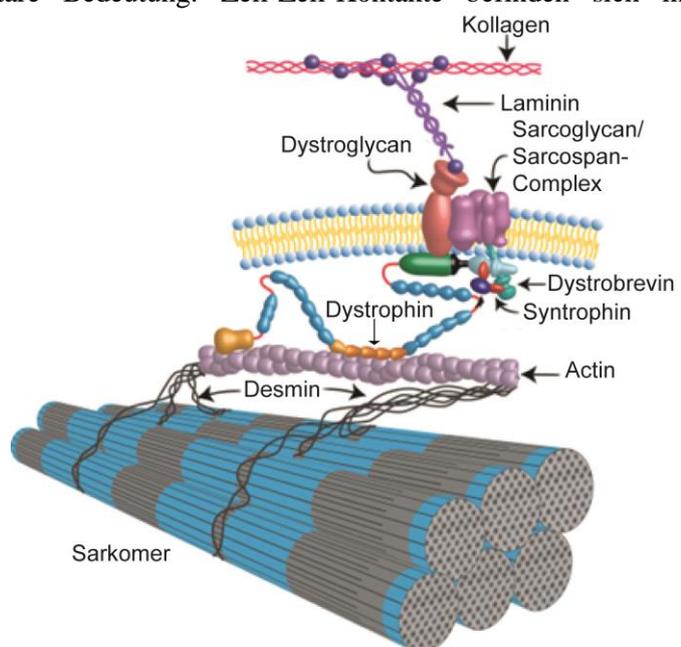
**Abbildung 5: Desmosomen.** (A) Elektronenmikroskopie eines Desmosoms: elektronendichte Mittellinie (DM), Plasmamembran (PM) und äußerer und innerer Plaques (ODP und IDP). (B) Molekulare Komposition der Desmosomen. Desmocollin (DSC), Desmoglein (DSG), Plakoglobin (PG), Plakophilin (PKP), Desmoplakin (DSP), Intermediärfilament (IF); modifiziert nach (Getsios et al, 2004).

### 1.3. Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten

Die Struktur der Herzmuskulatur vereinigt in sich sowohl Eigenschaften der Skelettmuskulatur als auch Eigenschaften, die von der glatten Muskulatur bekannt sind: Sie hat beispielsweise wie die Skelettmuskulatur mittelständige Zellkerne. Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) enthalten im Regelfall einen oder zwei Kerne pro Zelle, das heißt, sie stellen nur unter funktionellen Gesichtspunkten ein Synzytium dar. Mit der Skelettmuskulatur gemeinsam hat die Herzmuskulatur ihren regelmäßigen Aufbau aus speziellen quergestreiften Muskelfasern und das System des schnellen Kalziumionen-Einstroms durch Diaden (bei Skelettmuskulatur Triaden) von endständigen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums und T-Tubuli der Zellmembran. Dieser Aufbau ist für die Synchronisation der schnellen und kraftvollen Kontraktion unabdingbar und unterscheidet die Herz- und Skelettmuskulatur wesentlich von der glatten Muskulatur. Besonderheiten sind die Verzweigung und

die Verbindung der einzelnen Kardiomyozyten über Glanzstreifen, wohingegen Skelettmuskelvorläuferzellen während der Säugerembryonalentwicklung zu echten mehrkernigen Synzytien verschmelzen und somit lange Muskelfasern ausbilden. Die Glanzstreifen (Intercalated Discs) enthalten zur Impulsübertragung Gap-Junctions und zur Stabilisierung des Zellverbands und Kraftübertragung Desmosomen (Maculae adhaerentes) sowie Adhärenz-Verbindungen (Fasciae adhaerentes). Neue molekulare Untersuchungen der Glanzstreifen zeigen, dass typische desmosomale und Adhärenzverbindungs-Proteine (im Gegensatz zu deren jeweiligen Lokalisationen in Epithelien) zwischen Säuger-Herzmuskelzellen nicht getrennt auftreten und somit herzspezifische Adhäsionskontakte eines komplexen Mischtyps (Area composita) vorherrschen. Die Area composita gewährleistet durch die mechanische Kopplung der Kardiomyozyten sowie die schnelle Reizweiterleitung über das gesamte Herz die koordinierte Kopplung der Erregung und Kontraktion (Bernstein and Morley, 2006).

Pieperhoff et al. konnten durch Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie-Analysen zeigen, dass die Ausbildung der Glanzstreifen bzw. der Area composita erst relativ spät, nämlich erst in der postnatalen Entwicklung abgeschlossen ist. In der Herzentwicklung bilden sich Desmosomen und Adhärenzverbindungen bereits in der Mitte der Schwangerschaft aus, liegen aber bis zur Geburt als eigenständige räumlich voneinander getrennte Komplexe vor (Pieperhoff and Franke, 2007). Warum in Kardiomyozyten im Gegensatz zu Epithelien die unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakte gemischt vorliegen ist unbekannt. Genauso unverstanden ist, weshalb die Area composita erst postnatal ausgebildet wird und im Alter progressiv zunehmen. Kardiomyozyten bilden im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen nur ein funktionelles Synzytium aus. Daher haben die kardialen Zellkontakte für die Integrität des Herzens eine elementare Bedeutung. Zell-Zell-Kontakte befinden sich in Kardiomyozyten ausschließlich an den longitudinalen Enden, den Glanzstreifen. Auf der lateralen Seite dagegen adhären Herzmuskelzellen an ihre Umgebung über Zell-Matrix-Kontakte. Diese beiden Strukturen sind essenziell für die Übertragung der in den Sarkomeren erzeugten Kontraktionskraft. Costamere sind submembranöse Strukturen, die über das Zytoskelett mit der Z-Scheibe der Sarkomere verbunden sind. Über sie werden die Kontraktionskraft-induzierten Scherkräfte an die ECM weitergeleitet. Die laterale Adhäsion wird dabei über Integrine und den Dystrophin-Glykoprotein-Komplex



**Abbildung 6: Dystrophin-Glykoprotein-Komplex.** Schematische Darstellung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. Abbildung modifiziert nach (Barnabai 2011).

(DGC) vermittelt. Das ECM-Protein Laminin ist mit dem DGC über Dystroglycan verbunden. Das intrazelluläre 427kDa große Dystroglycan-bindende Dystrophin ist einerseits über Dystrobrevin mit Desmin und andererseits über die aminoternale Aktin-Binde-Domäne mit F-Aktin verknüpft. Des Weiteren bindet das 58kDa große Syntrophin an Dystrophin, welches als Adapter für Signalmoleküle fungieren kann. Stabilisiert wird der gesamte DGC durch den Sarcoglycan/Sarcospan-Komplex (Abb.6) (Barnabei, 2011; Lapidos et al., 2004). Die extrazelluläre Matrix der Herzmuskulatur, die die einzelnen Kardiomyozyten umgibt, wird als Interstitium bezeichnet, deren Kollagenmatrix (Kollagen I und III) eine kritische Rolle für die Funktionsfähigkeit und -erhaltung darstellt (Pelouch et al., 1993; Weber, 1989). Die kollagene, extrazelluläre Matrix des Interstitiums verbindet die einzelnen Kardiomyozyten miteinander und dient so als Gerüst und Krafttransmitter. Des Weiteren gibt sie dem Myokard einen optimalen Schutz gegen die starken Zugbelastungen, die während des Zyklus von Diastole und Systole auftreten können. Neben diesen Funktionen stellt das Interstitium auch Gerüst und Schutz für die Vaskularisierung und Innervierung des Myokards dar (Weber, 1989).

Bisher wurden Erkenntnisse über die Rolle und Funktion der Desmosomen und deren Komponenten vorwiegend in Zellkulturexperimenten mit epithelialen Zelllinien gewonnen. Desmosomen unterscheiden sich von allen anderen Zellkontakten aufgrund ihrer Eigenschaft einen starken, adhäsiven Zustand (Hyperadhäsion) zu erlangen. Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte unabhängig vom sonst für die Adhäsion unverzichtbaren extrazellulären  $Ca^{2+}$ . In Zellkultur-Versuchen mit Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass dieser hyperadhäsive Zustand bei Reparaturprozessen zurück in den kalziumabhängigen Zustand wechseln kann (Garrod et al., 2005). Modifiziert wird die Adhäsivität vermutlich durch Phosphorylierung der Cadherine durch die Protein-Kinase-C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) (Thomason et al., 2010).

Der Zusammenbau neuer Desmosomen wurde mittels Zeitrafferanalysen von Fluoreszenz-markierten DSP-Proteinen in Epithelzellen analysiert. Innerhalb der ersten drei Minuten erschien DSP punktuell an einer neugebildeten Zellgrenze. Nach weiteren 15 Minuten kolokalisierten erstmals PKP2 und DSP im Zytoplasma. Anschließend verankerte sich dieser Komplex an die Zellmembran (Godsel et al., 2005). Essenziell für den Einbau von DSP in das Desmosom ist die spezifische Phosphorylierung von DSP an Position S2849 durch die Serin/Threonin-Kinase PKC $\alpha$ . Die Phosphorylierung von DSP erfolgt jedoch nur in Anwesenheit von PKP2. Demnach fungiert PKP2 als Linkerprotein zwischen DSP und PKC $\alpha$  und ist wichtig für den Einbau von DSP und die daran assoziierten IFs (Bass-Zubek et al., 2008). Transfektionsexperimente mit humanen HT-1080 SL1 Zellen bestätigten, dass die Desmosomenformation direkt von der Expression von PKP2 abhängt (Koeser et al., 2003). Neusynthetisierte desmosomale Komponenten erreichen auf zwei unterschiedlichen Wegen den Zell-Zell-Kontakt. Während die zytosolischen Proteine DSP, PKP2 und PG über das Aktinfilamentsystem zur Membran gelangen (Green et al., 2010), werden DSG2 und DSC2 mittels Kinesinen über das mikrotubuläre Zytoskelett zur Membran transportiert (Nekrasova et al., 2011). In welcher Reihenfolge und durch welchen Mechanismus die anderen desmosomalen Proteine zur Zellmembran gelangen und

eingebaut werden ist bis heute unverstanden. Dafür sind, genauso wie zur Aufklärung der Halbwertszeit der Komponenten, weiterführende Experimente nötig. Die Degradation des Desmosoms erfolgt in Epithelien durch die vollständige Internalisierung des Desmosoms inklusive der Plaques und eines Teils des Zytoplasmas der benachbarten Zelle als Ganzes (Garrod et al., 2005). Inwieweit sich die Erkenntnisse aus epithelialen Zellkulturrexperimenten auf die Funktion der Desmosomen im adulten Herz übertragen lassen ist unklar. Die molekulare Komposition der Desmosomen ist abhängig vom jeweiligen Gewebe. In Kardiomyozyten bestehen die Desmosomen aus den Proteinen DSG2, DSC2, PG, PKP2 und DSP (Abb.7) (Garrod and Chidgey, 2008; Green and Simpson, 2007).

### **1.3.1. Die desmosomalen Cadherine Desmoglein-2 und Desmocollin-2**

Desmosomale Cadherine (Abb.7C) weisen sowohl untereinander als auch zu den klassischen Cadherinen eine 30%ige Homologie auf. DSG2 (~122kDa) und DSC2 (~100kDa) verfügen über fünf extrazelluläre Domänen (EC), die homo- und heterophile Verbindungen mit den Cadherinen der benachbarten Zelle eingehen können (Syed et al., 2002). Die ersten vier ECs (EC1-4) enthalten Cadherin-spezifische  $Ca^{2+}$ -bindende homologe Wiederholungsmotive, die die Zelladhäsion vermitteln. Es schließen sich eine extrazelluläre, transmembranöse und eine intrazelluläre Ankerdomäne an. Im Gegensatz zu DSG2 existieren von DSC2 zwei alternative Spleißformen, a und b. Das kürzere DSC2b entsteht durch die Insertion eines kleinen Exons, das ein Stoppkodon enthält. Dadurch fehlt DSC2b anders als DSC2a und DSG2 ein intrazelluläres Cadherin-typisches Segment über das PG gebunden werden kann. Bei DSG2 schließt sich eine Prolin-reiche Linkerdomäne an, über die Interaktionen mit PG, DSP, PKP1 und DSC1 erfolgen (Kami et al., 2009).

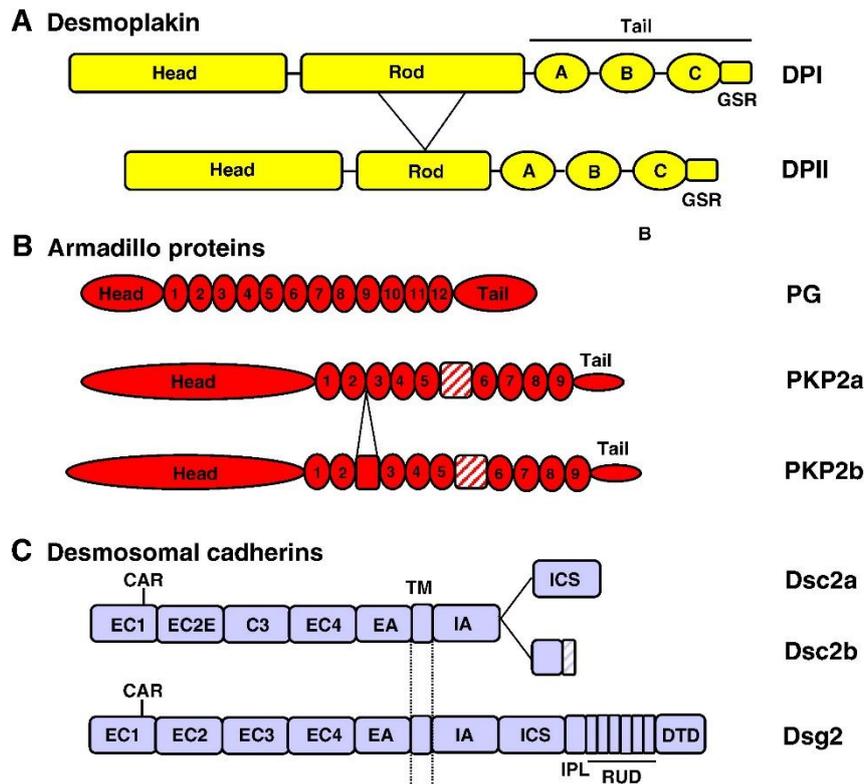
### **1.3.2. Armadilloproteine**

Die Armadilloproteine stellen wichtige strukturelle Komponenten der Desmosomen dar, da sie als sogenannte Linkerproteine die Interaktion von Desmoplakin mit den desmosomalen Cadherinen vermitteln. Sie sind durch eine für alle Armadilloproteine kennzeichnende zentrale arm repeat Domäne charakterisiert, welche aus einer variablen Anzahl eines 42 Aminosäure langen Wiederholungsmotivs zusammengesetzt ist (Abb.7B).

#### *1.3.2.1. Plakoglobin*

Das 86 kDa große Plakoglobin ist das am besten charakterisierte Armadilloprotein. PG, auch bekannt unter der Bezeichnung  $\gamma$ -Catenin, besitzt 12 Armadillo-Wiederholungsmotive und zeigt eine große Homologie zu  $\beta$ -Catenin (Chitaev et al., 1996; Witcher et al., 1996). Es ist als einziges desmosomales Protein ein konstitutiver Bestandteil sowohl der Desmosomen, als auch der Adhärenzverbindungen

(Cowin et al., 1986). In den Adhärenzverbindungen fungiert Plakoglobin als Bindeglied zwischen den klassischen Cadherinen und dem Aktin-Zytoskelett. Die Bindungsaffinität von Plakoglobin zu N- bzw. E-Cadherin ist jedoch weitaus geringer als zu den desmosomalen Cadherinen. Dabei konnte die stärkste Interaktion zwischen Plakoglobin und Desmoglein und eine etwas schwächere Assoziation zu Desmocollin nachgewiesen werden (Chitaev et al., 1996). Sowohl  $\beta$ -Catenin als auch Plakoglobin fungieren als Regulatoren der T-Zell-Faktor (TCF)-Familie von Transkriptionsfaktoren und Modulatoren des Wnt-Signalwegs (Chien et al., 2009; Huelsken and Behrens, 2002).



**Abbildung 7: Struktur der desmosomalen Proteine. (A)** Desmoplakin: Dargestellt sind die beiden Desmoplakin Isoformen. Plakin-Wiederholungsdomänen (A, B, C), Glycin-Serin-Arginin reiche Domäne (GSR). **(B)** Armadillo Proteine: Plakoglobin (PG) mit 12 Armadillodomänen. Die beiden Plakophilin Isoformen mit 9 Armadillodomänen Zwischen 5 und 6 mit einem Insert (gestrichelte Box). PKP2b weist zu PKP2a ein 44 Aminosäure großes Insert zwischen Armadillodomäne 2 und 3 auf. **(C)** Desmosomale Cadherine: Die Zelladhäsion Erkennungsstelle (CAR) vermittelt die adhäsive Funktion. Desmocollin-2a (DSC2a) und Desmoglein-2 weisen an in der zytosmatischen Region eine interzelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz auf (ICS), Extrazelluläre Cadherindomänen, (EC1-4), extrazellulärer Ankerdomäne (EA), Transmembrandomäne (TM), intrazellulärer Anker (IA), interzelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz (ICS), intrazellulär Prolin-reicher Linker (IPL), Wiederholungsdomäne (WD); Desmoglein terminale Domäne (DTD). Die nicht maßstabsgetreue Abbildung ist modifiziert nach (Garrod and Chidgey, 2008).

### 1.3.2.2. Plakophilin-2

Die ebenfalls zu den Armadilloproteinen gehörende Gruppe der Plakophiline sind als einzige „Junction“-Proteine basisch. Sie enthalten 9 Armadillo-Motive, die von einem langen N-Terminus mit einer konservierten Head-Domäne (homology region, HR) und einem kurzen C-Terminus begrenzt werden (Choi and Weis, 2005; Hatzfeld, 2007). An den N-Terminus können desmosomale Cadherine,

PG und DSP binden. Die Plakophilinfamilie umfasst 3 Mitglieder (PKP1-3) mit insgesamt 5 Spleißvarianten. Von PKP1 und PKP2 existieren jeweils eine kürzere „a“-Form und eine längere „b“-Form, die sich durch die Insertion von 21 Aminosäuren zwischen Armadillo-Motiv 3 und 4 (PKP1) bzw. von 44 Aminosäuren zwischen Motiv 2 und 3 (PKP2) unterscheiden (Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Alle drei Plakophiline weisen ein gewebespezifisches und differenzierungsabhängiges Expressionsmuster auf, wobei PKP2 (MW: 97 kDa) das am weitesten verbreitete Plakophilin ist. Es kommt in den Desmosomen einfacher Epithelien, der Basalschicht mehrschichtiger Epithelien, aber auch in Geweben wie den Lymphknoten, der Leber oder dem Herzmuskel vor (Mertens, 1996; Mertens, 1999). Im Gegensatz zu allen anderen PKP2-haltigen Geweben ist PKP2a in Kardiomyozyten die dominant exprimierte Isoform. Der funktionelle Unterschied zwischen den beiden Spleißvarianten ist nicht bekannt (Gandjbakhch et al., 2011). PKP1 und PKP3 hingegen werden überwiegend epithelial exprimiert. Während PKP1 suprabasal hauptsächlich in den Desmosomen der Körner- und Stachelschicht mehrschichtiger Epithelien zu finden ist, ist PKP3 auch ein Bestandteil der Desmosomen einfacher epithelialer Gewebe. In komplexen Epithelien, wie der Epidermis, zeigt PKP3 eine einheitliche Expression und ist in allen Zellschichten gleich stark vertreten (Schmidt et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Müller et al. beobachteten in einer Fibroblasten-Zelllinie die Translokalisierung von PKP2 in den Zellkern. Sie konnten zeigen, dass infolge einer Phosphorylierung durch MAP/Microtubule-Affinity-Regulating-Kinase-3 (MARK3 oder CTAK1) PKP2 an das Adapterprotein 14-3-3 binden kann und in den Zellkern transportiert wird (Muller et al., 2003). Dort kann PKP2 mit RPC155, der größten Untereinheit des RNA-Polymerase-III-Holoenzym, interagieren. Welche Funktion diese Interaktion ausübt ist bisher allerdings ungeklärt (Mertens et al., 2001). In neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte mittels MicroRNA-Knockdown-Untersuchungen gezeigt werden, dass Pkp2 an der Reizweiterleitung beteiligt ist (Sato et al., 2011; Sato et al., 2009). In dieser *in-vitro*-Studie beeinflusste Pkp2 die Expression und Funktion des für die Ionenkanäle Connexin43 und den Natriumkanal Nav1.5 wichtigen Strukturproteins AnkyrinG.

### 1.3.3. Desmoplakin

Sowohl die Plakophiline als auch Plakoglobin sind mit den im äußeren und inneren Plaque liegenden Plakinen assoziiert, welche die Anbindung der Intermediärfilamente an den transmembranen Komplex vermitteln. Desmoplakin (DSP) ist das einzige in den Desmosomen vorkommende Protein der Plakinfamilie (Desmoplakin, Envoplakin, Periplakin und Plectin), das in allen Desmosomen exprimiert ist. Es ist essenziell für die Formation dieser adhäsiven Zellverbindungen und für die Organisation des Zytoskeletts. Desmoplakin wird in zwei Spleißformen exprimiert, DSPI (MW 250 kDa) und DSPII (MW 215 kDa). Beide Isoformen liegen als Homodimere vor. Aufgebaut ist DSP aus der N-terminalen Plakindomäne, gefolgt von einer zentralen gewundenen Stabdomäne und dem C-Terminus, der aus drei homologen Plakin-Repeat-Domänen (PRD) und einer Glycin-Serin-Arginin-reichen Region besteht (Sonnenberg and Liem, 2007). Über die PRDs ist DSP direkt mit den Intermediärfilamenten verbunden

(Fontao et al., 2003). Je nach Zelltyp sind so Keratinfilamente (epitheliale Zellen), Desminfilamente (Kardiomyozyten) oder Vimentin-Intermediärfilamente (mesenchymale Zellen) mit den Desmosomen verbunden. Durch Phosphorylierung von S2849 stromabwärts der PRDs wird diese Bindungsaffinität herabgesetzt (Stappenbeck et al., 1994). Die Plakin-Domäne ist charakterisiert durch einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helizes (Jefferson et al., 2007; Jefferson et al., 2004), über die DSP mit den PKPs und PG verbunden ist (Bornslaeger et al., 2001; Kowalczyk et al., 1997). Die gewundene Stabdomäne enthält wiederholte Heptad-Domänen zur Bildung von Homodimeren (Abb.7A).

#### **1.4. Mausmodelle der herzspezifischen desmosomalen Proteine**

Die meisten Erkenntnisse über Desmosomen und deren Bestandteile wurden in Zellkulturexperimenten gewonnen. Diese haben jedoch den Nachteil, dass dort hämodynamische, humorale sowie mechanische Einflüsse kaum zum Tragen kommen. Um die Rolle der desmosomalen Proteine unter physiologischen Bedingungen zu charakterisieren, verwendeten eine Reihe von Arbeitsgruppen gentechnisch veränderte Tiermodelle. Für Dsg2, Pg, Pkp2 und Dsp wurden bereits klassische Knockout-Mausmodelle etabliert und untersucht. Homozygote Dsg2-Knockout-Mäuse versterben bereits, bevor im Trophoblast desmosomale Strukturen nachweisbar sind (Eshkind et al., 2002). Pg-defiziente Mäuse sind aufgrund ventrikulärer Rupturen zwischen Embryonaltag 12,5 (E12.5) und der Geburt letal. Dabei wurden eine reduzierte Anzahl und eine defekte Struktur der Desmosomen beobachtet (Bierkamp et al., 1996; Ruiz et al., 1996). Klassische Dsp-defiziente Mäuse überlebten nicht länger als E6.5 aufgrund eines fehlgebildeten Eizylinders (Gallicano et al., 1998). Durch tetraploide Rettungsexperimente verstarben homozygote Dsp<sup>-/-</sup>-Embryos erst kurz nach der Gastrulation durch Defekte im Herzmuskel und im Hautepithel (Gallicano et al., 2001). Der Verlust von Pkp2 im klassischen, murinen Knockout-Modell führt zur embryonalen Letalität zwischen E10.5-E11. Wahrscheinliche Ursache dafür ist eine Veränderung der Herzmorphologie und eine gestörte Blutversorgung. In Abwesenheit von Pkp2 ist Dsp nicht an den Zell-Zell-Verbindungen gebunden und akkumuliert im Zytoplasma (Grossmann et al., 2004). Heterozygote Pkp2<sup>+/-</sup>-Mäuse unterscheiden sich nicht von den wildtypischen Wurfgeschwistern. Nach einer Flecainid-induzierten Blockade des Natriumstroms entwickelten diese allerdings im Gegensatz zu ihren Wildtypgeschwistern ventrikuläre Arrhythmien (Cerrone et al., 2012).

Zur Überwindung der embryonalen Letalität und zur gewebespezifischen Funktionsanalyse wurden für Dsg2, Dsp und Pg konditionelle Knockout-Modelle generiert. In der konditionellen Dsg2-Knockout-Maus werden infolge der Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen Exon 4-6 ausgeschnitten, ohne einen Frameshift zu induzieren. Demzufolge fehlen dem mutierten Dsg2-Protein wesentliche Teile von den ersten beiden extrazellulären Cadherin-Domänen. Von den konstitutiv deletierten Dsg2<sup>-/-</sup>-Mäusen versterben zwei Drittel während der intrauterinen Entwicklung. Das andere Drittel wird scheinbar gesund geboren. 14 Tage nach der Geburt entwickeln diese Tiere eine dilatative Kardiomyopathie. Die Kardiomyozyten der Dsg2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine kalzifizierende Nekrose. Die

zugrunde gegangenen Herzzellen werden progressiv durch fibrotisches Gewebe ersetzt (Krusche et al., 2011). Die hautspezifische Ablation von Dsp wirkte sich nur geringfügig auf die Struktur der Desmosomen aus. Jedoch verursachte die fehlende Verbindung mit dem zytoskelettalen Intermediärfilament-System eine verstärkte Hautfragilität (Vasioukhin et al., 2001). Die herzspezifische, embryonale Deletion von Dsp führte zur embryonalen Letalität zwischen E10 und E12. Einige dieser Tiere überlebten bis nach der Geburt, verstarben aber innerhalb der ersten zwei Wochen an einer progressiven Herzinsuffizienz, die mit ventrikulären Arrhythmien einherging. Die Dsp-defizienten Mäuse zeigten eine Suppression des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs sowie eine erhöhte Kardiomyozyten-Apoptose und deren Ersatz durch fibrotisches und adipöses Gewebe (Garcia-Gras et al., 2006). Die herzspezifisch-induzierbaren Pg-Knockout Mäuse überlebten mehr als 20 Monate nach Beginn der Pg-Ablation. Zwei Monate nach Induktion des Knockouts wiesen die Knockout-Mäuse kardiale Dysfunktionen auf. Histologische Analysen dokumentierten einen progressiven Kardiomyozytenverlust, Infiltrationen von inflammatorischen Zellen und eine signifikante Fibrosierung. Außerdem zeigten die Pg<sup>-/-</sup>-Herzen eine Reduktion desmosomaler Proteine an den Glanzstreifen und eine veränderte Ultrastruktur der Desmosomen (Li et al., 2011a; Li et al., 2011b). Zusammengefasst zeigen diese in-vivo-Untersuchungen die Bedeutung der Desmosomen für die kardiale Herzentwicklung und Funktion. Rückschlüsse auf deren Rolle in terminal-differenzierten Kardiomyozyten lassen sich jedoch nicht ziehen.

### **1.5. Desmosomal bedingte Erkrankungen**

Mutationen in desmosomalen Genen führen zu einer ganzen Bandbreite von humanen Erkrankungen. Aufgrund ihrer primär stabilisierenden Funktion sind Desmosomen essenziell für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität differenzierter, mechanisch stark beanspruchter Gewebe. Dies zeigt sich in desmosomalen Erkrankungen, die überwiegend die Haut und das Herz betreffen.

Die autoimmunen Hauterkrankungen Pemphigus Vulgaris (PV) und Pemphigus Foliaceus (PF) sind charakterisiert durch den Verlust der Zell-Zell-Kontakte von Keratinozyten (Akantholyse) und der Formation von Blasen in der Epidermis (in PV) oder in den Schleimhäuten (in PF) (Payne et al., 2004). Die Ziele der körpereigenen Antikörper sind DSG3 (in PV) (Amagai et al., 1991) bzw. DSG1 (in PF) (Ishii et al., 1997). Die unterschiedlichen Pathogenesemuster reflektieren die Verteilung und Expression der DSGs in den Hautschichten (Shirakata et al., 1998). Der Mechanismus des Antikörper-induzierten Verlusts der Zelladhäsion ist bis heute nicht aufgeklärt und Gegenstand kontroverser Diskussionen (Brooke et al., 2012).

Die Infektionskrankheiten Bullous Impetigo und Staphylococcal Scalded Skin Syndrome betreffen überwiegend Kinder unter 5 Jahren und immungeschwächte Erwachsene (Nishifuji et al., 2008). Dabei zeigen Patienten nach Befall mit pathogenen *Staphylococcus aureus* Bakterien die gleichen klinischen Symptome wie Menschen mit PF, da hier ebenfalls DSG1 betroffen ist. Die von den Bakterien

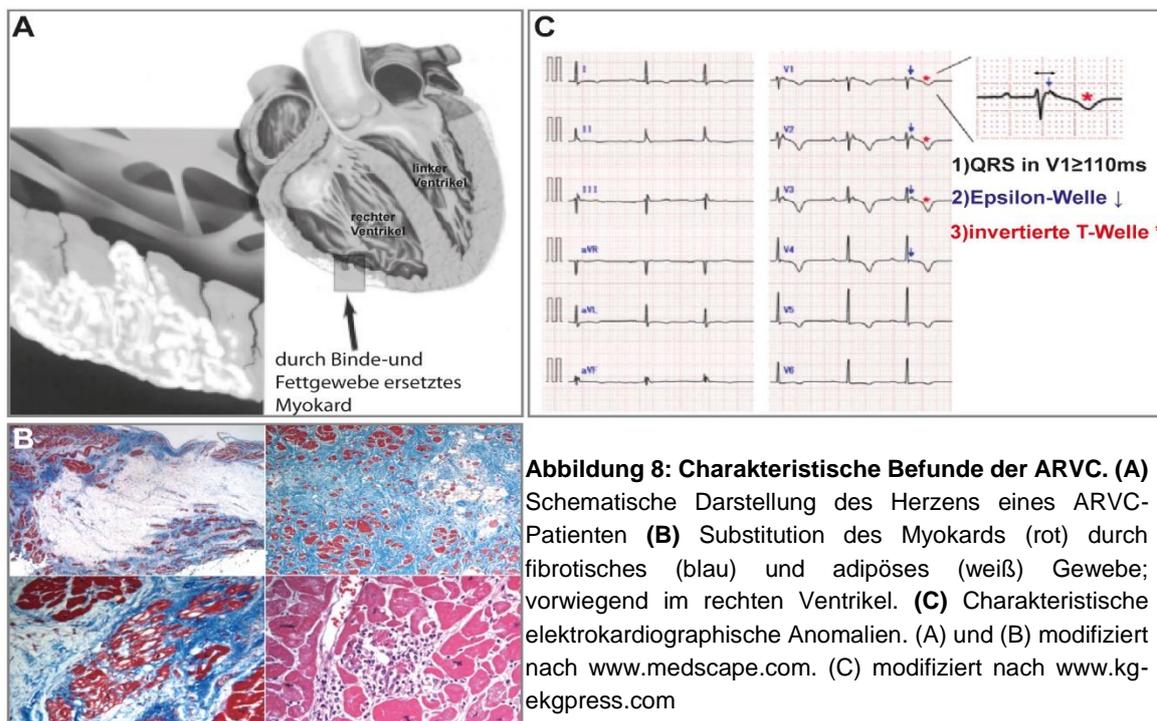
gebildeten Glutamat-spezifischen Serinproteasen schneiden spezifisch eine einzelne Peptidverbindung in der extrazellulären Domäne von DSG1, was zur Akantholyse führt (Hanakawa et al., 2002).

Wie wenig von der Funktion der Desmosomen und von der Interaktion der Komponenten untereinander und mit anderen Zellkompartimenten bekannt ist, wird durch die auf Mutationen in desmosomalen Genen basierende große Anzahl genetischer Erkrankungen wiedergespiegelt. Unterschiedliche Mutationen resultieren in Haut- und/oder Herzerkrankungen mit oder ohne Auswirkungen auf die Haare. Mutationen, die zum Verlust von DSG4 führen, sind für Störungen der Haarfollikeldifferenzierung verantwortlich (Kljuic et al., 2003). DSG1-Haploinsuffizienz resultiert in palmoplantare Keratoderma (PPK), eine Erkrankung die durch eine starke Verhornung der Sohlen und Handinnenflächen gezeichnet ist (Rickman et al., 1999). Menschen mit homozygoten Mutationen in PG weisen das Naxos-Syndrom auf (McKoy et al., 2000). Neben PPK und wollenem Haar entwickeln die Patienten die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC), die später näher betrachtet wird. Einige Loss-of-function-Mutationen in PG führen zu Hautfragilität, PPK und wollenem Haar ohne Anzeichen einer Kardiomyopathie (Cabral et al., 2010). Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt eine rezessive PG-Mutation in einem Patienten mit PPK, ARVC und vollständigen Haarausfall (Erken et al., 2011). Pigors et al. berichteten über eine letale Erkrankung, die auf einer Nonsense-Mutation in PG basiert. Dies resultiert in eine angeborene Hautfragilität mit Epidermolysen und transkutanäischem Flüssigkeitsverlust bei normaler Herzfunktion (Pigors et al., 2011). Eine DSP-Haploinsuffizienz verursacht PPK (Armstrong et al., 1999).

Zusammengesetzte heterozygote aminoterminalen Missense-Mutationen mit carboxyterminalen Nonsense-Mutationen in DSP führen zu PPK, Hautfragilität und wollenem Haar, oder kompletten Haarverlust mit oder ohne Erkrankung des Herzens (Norgett et al., 2000; Whittock et al., 2002). Am carboxyterminalen Ende trunciertes DSP verursacht die Akantholytische Epidermolysis Bullosa. Diese letale Erkrankung zeichnet sich durch totalen Haarausfall, Verlust der Nägel und transkutanem Flüssigkeitsverlust aufgrund umfangreicher Hauterosionen aus (Jonkman et al., 2005). Verschiedene Mutationen in PKP1 resultieren in das Ektodermale Dysplasie Hautfragilität Syndrom, eine Erkrankung die mit Fehlbildungen der Haare, Nägel, Zähne und/oder Haut einhergeht (Ersoy-Evans et al., 2006; Pieperhoff et al., 2010).

Diese Beispiele zeigen das weite Spektrum an Syndromen, die auf Mutationen in desmosomalen Genen bzw. auf desmosomalen Komponenten als Antigen-Ziel basieren. Allen gemeinsam ist ein Hautphänotyp. Einzige bisher bekannte Ausnahme ist die ARVC, eine ausschließlich das Herz betreffende Erkrankung. Interessanterweise wurden in allen kardial exprimierten, desmosomalen Genen (DSP, PKP2, PG, DSG2 und DSC2) Mutationen in ARVC-Patienten identifiziert (Green and Simpson, 2007). Bei der ARVC handelt es sich um eine meist autosomal-dominant vererbte Kardiomyopathie mit variabler Penetranz, die besonders in jungen Menschen und Sportlern (Corrado et al., 1990; Thiene et al., 1988) meist zu Arrhythmien, Herzinsuffizienz und/oder plötzlichem Herztod führt. Klinische Manifestationen sind Vergrößerung und Dysfunktion des rechten Ventrikels, Ersetzung von

Kardiomyozyten durch fibrotisches und adipöses Gewebe, die primär den rechten aber im Krankheitsverlauf auch den linken Ventrikel betreffen und charakteristische elektrokardiographische Anomalien mit primärem Ursprung im rechten Ventrikel (Murray, 2012) (Abb.8). Unglücklicherweise ist der plötzliche Herztod in 20-50% der Indexpatienten die erste klinische Manifestation (Dalal et al., 2005; Hamid et al., 2002; Nava et al., 2000). Insgesamt ist ARVC die Ursache für bis zu 20% aller plötzlicher Herztodesfälle. Unter Sportlern scheint diese Zahl sogar noch höher zu sein (Corrado et al., 1990; Tabib et al., 2003; Thiene et al., 1988). Die Schätzungen der Prävalenz in der Gesamtbevölkerung liegen zwischen 1:2000 bis 1:5000 (Basso et al., 2009), wobei die tatsächliche Zahl aufgrund der nicht identifizierten bzw. falsch klassifizierten Fälle wahrscheinlich sogar bei 1:1000 liegt (Pankuweit et al.,



2009; Sen-Chowdhry et al., 2010a). Lange Zeit wurde vermutet, dass Männer häufiger als Frauen von der ARVC betroffen sind (Basso et al., 2009). Studien in den USA zeigen allerdings keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern (Dalal et al., 2005). Daher wird vermutet, dass diese Differenz vielmehr durch sportliche und physische Aktivitäten als durch geschlechtsspezifische Unterschiede hervorgerufen wird (Murray, 2012). Die Diagnose der ARVC beruht auf den 1994 von einer internationalen Task-Force erstellten und im Jahr 2010 modifizierten Kriterien (Marcus et al., 2010; McKenna et al., 1994). Die Diagnosekriterien sind in sechs Kategorien unterteilt: Strukturelle Veränderungen wie eine eingeschränkte Rechtsherzfunktion werden mittels Echokardiographie oder Magnetresonananz detektiert. Histopathologische Auffälligkeiten wie eine fibröse Umbildung des rechtsventrikulären Myokards der freien Wand bei geschätzt weniger als 50% residueller Kardiomyozyten werden in Biopsien analysiert. Mittels Elektrokardiographie werden die Patienten auf Vorkommen von Re- (Inversion der T-Welle) und Depolarisationsstörungen (Epsilon-Wellen) sowie Arrhythmien untersucht. Ebenso ist die Familienanamnese ein wichtiges Diagnosekriterium. Der Verlauf der ARVC wird in 4 Phasen unterteilt: In der frühen asymptomatischen Phase kann es dennoch zum Auftreten von Arrhythmien und

plötzlichem Herztod kommen. In der zweiten Phase treten symptomatische Arrhythmien auf, die zu Palpitationen, Synkopen und plötzlichen Herztod führen. Die dritte Phase zeichnet sich durch eine Rechtsherzinsuffizienz bei erhaltener linksventrikulärer Funktion aus. Die biventrikuläre Herzinsuffizienz der vierten Phase wird häufig mit einer dilatativen Kardiomyopathie verwechselt (Saguner, 2011). Die frühe asymptomatische Phase und die sehr variable Penetranz, auch zwischen nah verwandten Personen, erschweren die Diagnose der ARVC erheblich. So wird seit 2010 auch ein genetisches Screening bei Patienten mit einem ARVC-Verdacht empfohlen und eine detektierte Mutation in einem ARVC-Gen gilt als Hauptkriterium.

Die Behandlungsmöglichkeiten der ARVC sind sehr limitiert. In Nordamerika erhalten 77% der Patienten mit diagnostizierter ARVC einen implantierbaren Kardioverter/Defibrillator (ICD) (Marcus et al., 2009). Die Höhe der durch diese Therapie geretteten Leben scheint jedoch übertrieben zu sein, da die meisten Patienten eine normale Linksherzfunktion aufweisen und damit anhaltende ventrikuläre Tachyarrhythmien tolerieren können (Marcus and Abidov, 2012). Neben der Empfehlung der Vermeidung größerer körperlicher Anstrengungen werden Patienten bisher nur mit antiarrhythmischen Medikamenten wie Betablockern, Sotalol oder Amiodaron behandelt. Diese Medikamente haben aber keinen Einfluss auf die Mortalitätsrate (Smith, 2011).

Die ARVC wurde erstmals 1978 in der Gruppe von Guy Fontaine beschrieben (Frank et al., 1978). Eingeführt wurde die ARVC dabei als rechtsventrikuläre Dysplasie, da eine Entwicklungsstörung als Ursache vermutet wurde. Weil klinische und morphologische Untersuchungen keine strukturellen Geburtsdefekte zeigten, erfolgte eine Umbenennung in rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Thiene et al., 1988). Mit der Erkenntnis, dass ventrikuläre Arrhythmien die vorherrschende klinische Manifestation dieser Erkrankung sind, erfolgte die abermalige Umbenennung zu ARVC (McKenna et al., 1994). Heutzutage ist bekannt, dass strukturelle Defekte nicht nur auf die rechten Ventrikel beschränkt sind. Es wurden sogar über Fälle mit biventrikulären und linksventrikulär-dominanten Formen berichtet (Basso et al., 2009; Sen-Chowdhry et al., 2010b). Daraufhin erfolgten kürzlich Vorschläge zur Umbenennung der ARVC in Arrhythmogene Kardiomyopathie (Basso et al., 2012) bzw. Arrhythmogene Ventrikuläre Kardiomyopathie (Jacoby and McKenna, 2012). Im Bewusstsein dieser aktuellen Diskussion und der Beteiligung des linken Ventrikels wird diese Erkrankung in dieser Arbeit jedoch weiterhin als ARVC bezeichnet.

Erst nach Evaluierung der ARVC-Diagnosekriterien im Jahr 1994 wurde der erste Chromosomenlokus durch Kopplungsanalysen identifiziert (Rampazzo et al., 1994). Seitdem wurden zwölf ARVC-Loci (ARVC1 bis 12) bestimmt, wobei durch genetische Analysen bisher 9 Kandidatengene gefunden wurden (Tab.1). Keine Kandidatengene wurden bisher für ARVC1 (Chromosomenlokus 14q12-22) (Severini et al., 1996), ARVC6 (10p12-p14) (Li et al., 2000) und ARVC7 (10q22) (Melberg et al., 1999) entdeckt. Als erstes Krankheitsgen wurde PG in Patienten mit der ARVC-assoziierten Naxos-Krankheit im Jahr 2000 determiniert. Diese Entdeckung initiierte die Suche nach ARVC-induzierenden Mutationen in weiteren desmosomalen Genen. Norgett et al. entdeckte eine autosomal-rezessive Mutation in DSP in

einer weiteren kardiokutanen ARVC-assoziierten Erkrankung, dem Carvajal-Syndrom (Norgett et al., 2000). Seitdem wurden autosomal-dominante Mutationen ohne begleitendes kutanes Syndrom in allen herzspezifischen, desmosomalen Genen identifiziert: DSP (Rampazzo et al., 2002), PKP2 (Gerull et al., 2004), DSG2 (Pilichou et al., 2006), DSC2 (Heuser et al., 2006; Syrris et al., 2006) und PG (Asimaki et al., 2007). In seltenen Fällen wurden auch rezessive Mutationen in PKP2 (Awad et al., 2006) und DSC2 (Simpson et al., 2009) detektiert. Ungefähr die Hälfte aller ARVC-Patienten weisen pathologische Mutationen in desmosomalen Genen auf (den Haan et al., 2009; Protonotarios et al., 2011), wobei dieser Anteil in einer britischen Studie sogar 70% erreichte (Quarta et al., 2011). Aus diesem Grund wird die ARVC als Erkrankung der Desmosomen angesehen (Basso et al., 2012; Gerull et al., 2004). In bis zu 11% der Patienten wurden auch mehr als eine Mutation detektiert (Sen-Chowdhry et al., 2010b). 58% der holländischen Indexpatienten wiesen pathologische Mutationen in PKP2 auf. In familiären Fällen erhöhte sich der Anteil sogar auf 90% (Cox et al., 2011). Damit ist PKP2 das Hauptkrankheitsgen, gefolgt von DSG2, DSP, DSC2 und PG. Wahrscheinliche Ursache für die Uneinheitlichkeit der Daten sind das Vorkommen von Gründermutationen, verschiedene Definitionen der Pathogenität und geographische Unterschiede genetischer und nicht-genetischer Faktoren (Basso et al., 2012). ARVC bzw. ARVC-ähnliche Erkrankungen wurden auch mit Mutationen in nicht-desmosomalen Genen in Verbindung gebracht. Der Ryanodine Rezeptor 2 (RYR2) ist in der Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum involviert. In ARVC-Patienten führen Mutationen in RYR2 zum fibrotisch-adipösen Ersatz von Herzgewebe, ohne jedoch die Struktur des rechten Ventrikels zu verändern. (Rampazzo et al., 1995; Tiso et al., 2001). Daher stuften Basso et al. Mutationen in RYR2 nur als Phänokopie der ARVC ein (Basso et al., 2012). In einer ARVC-Familie wurden Mutationen im Promotorbereich des Transforming Growth Faktor  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ) identifiziert. Beffagna et al. spekulieren, dass dies möglicherweise zur Überexpression von TGF $\beta 3$  und somit zu einer vermehrten Fibrose führt (Beffagna et al., 2005). Bei ARVC-Patienten aus Neufundland wurde ein hochgradig penetranter Typ der ARVC mit Mutationen im Transmembranprotein 43 (TMEM43) assoziiert. Als Zielgen des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor Gamma (PPARG) ist TMEM43 Bestandteil des adipogenetischen Signalwegs, was möglicherweise den fibrotisch-adipösen Ersatz von Kardiomyozyten in ARVC-Patienten erklärt (Merner et al., 2008). Mutationen in den zytoskelettalen Proteinen Desmin und Titin sind häufig die Ursache für die dilatative Kardiomyopathie. In einigen Fällen führen Mutationen in Desmin (van Tintelen et al., 2009) und Titin (Taylor et al., 2011) zu einem überlappenden ARVC-ähnlichem Syndrom, das noch nicht vollständig aufgeklärt wurde.

Der hohe Anteil an Mutationen in desmosomalen Genen und die schwache Korrelation der Mutationen in nicht-desmosomalen Genen mit der ARVC führte zu dem verbreiteten Konsens, dass die desmosomale Dysfunktion der Schlüsselfaktor des einheitlichen Pathomechanismus der ARVC ist (Basso et al., 2012; Gerull et al., 2004; Murray, 2012; Sen-Chowdhry et al., 2010a). Der weitere Krankheitsverlauf ist jedoch bis heute ungeklärt. Drei verschiedene Hypothesen für die Ursachen des ARVC-Krankheitsverlaufs werden in der Literatur derzeit diskutiert. Die Hypothese der myokardialen

Referenz	Lokus	Gen	Erbgang	Kommentar
<b>desmosomale Gene</b>				
McKoy et al., 2000	17q21	Plakoglobin	AR <sup>a</sup>	Kardiokutanes Syndrom
Asimaki et al., 2007	17q21	Plakoglobin	AD	
Norgett et al., 2000	6p24	Desmoplakin	AR <sup>b</sup>	Kardiokutanes Syndrom
Rampazzo et al., 2002	6p24	Desmoplakin	AD	
Gerull et al., 2004	12p11	Plakophilin-2	AD, AR	
Pilichou et al., 2006	18q12	Desmoglein-2	AD	
Syrris et al., 2006	18q12	Desmocollin-2	AD, AR	
<b>nicht-desmosomale Gene</b>				
Tiso et al., 2001	1q42-q43	Ryanodine Rezeptor 2	AD	CPVT (Phänokopie)
Beffagna et al., 2005	14q23-q24	Transforming Growth Faktor $\beta$ 3	AD	Pathologisch oder Modifikator?
Merner et al., 2008	3p25	Transmembran Protein 43	AD	
van Tintelen et al., 2009	2q35	Desmin	AD	Misch-Syndrom (DCM und HCM)
Taylor et al., 2011	2q31	Titin	AD	Misch-Syndrom (VF)

**Tabelle 1: ARVC-assoziierte Gene:** a Naxos-Krankheit; autosomal-dominant (AD); autosomal-rezessiv (AR); b Carvajal-Krankheit; Katecholaminerge Polymorphe Ventrikuläre Tachykardie (CPVT); Dilatative Kardiomyopathie (DCM); Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM); Vorhofflimmern (VF); modifiziert nach (Basso et al., 2012).

Dystrophie wurde bereits 1996 postuliert (Basso et al., 1996). Übereinstimmungen der ARVC mit Skelettmuskel-Dystrophien suggerieren, dass Mutationen in ARVC-Genen den apoptotischen oder nekrotischen Verlust von Kardiomyozyten verursachen. Im Verlauf der Zeit führt die myokardiale Dystrophie zum Phänotyp der ARVC. Eine zweite Hypothese besagt, dass inflammatorische Prozesse den Verlust der Kardiomyozyten verursachen. Die Infiltration inflammatorischer Zellen wird in ca. 75% der ARVC-Fälle beobachtet (Basso et al., 1996; Thiene et al., 1991). Die Entzündungsreaktion könnte demnach Folge der in der Apoptose freiwerdenden proinflammatorischen Zytokine oder einer Virusinfektion sein. Die dritte Hypothese wurde 2006 von Garcia-Gras aufgestellt. Der Verlust der Desmosomen in embryonal, herzspezifisch deletierten Dsp-Mäusen führt vermutlich zur Translokation von PG in den Zellkern. Aufgrund der kompetitiven Funktion von PG zu  $\beta$ -Catenin wird dadurch der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg supprimiert. Dies resultiert in einer erhöhten Apoptoserate von Kardiomyozyten und einer verstärkten Adipogenese und Fibrose (Garcia-Gras et al., 2006). Ursache dafür ist das Umschalten vom myogenetischem zum adipogentischem Programm in epikardialen Vorläuferzellen. Diese wandern der Theorie nach in das Myokard ein und bilden die Quelle für das adipöse Ersatzgewebe (Lombardi et al., 2009). Im Gegensatz zu dieser Hypothese zeigten adulte Mäuse mit kardial deletiertem Pg eine Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Diese Tiere wiesen eine erhöhte mRNA-Expression der Wnt-Zielgene CyclinD1, c-jun und c-myc auf. Gleichzeitig

waren auf Proteinebene das aktivierte  $\beta$ -Catenin ( $\alpha$ Ctnnb1) und die phosphorylierte Glykogen Synthase Kinase 3 (pGSK3) stärker exprimiert (Li et al., 2011b). Dies zeigt, dass der Pathomechanismus einer desmosomalen Dysfunktion bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

### **1.6. Zielstellung**

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der desmosomalen Proteine Pkp2 und Dsp in der Area composita zu untersuchen. Wie bereits erwähnt wird die Area composita erst postnatal in den Kardiomyozyten gebildet. Da die bisherigen Ergebnisse hauptsächlich auf Zellkultorexperimenten oder der Untersuchung von klassischen Knockout-Modellen beruhen, die embryonal letal sind, ist die Funktion der beiden desmosomalen Proteine im adulten Herz bis heute ungeklärt. Aufgrund der Tatsache, dass Desmosomen essenziell an der Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität und der zellulären Integrität beteiligt sind, ist es notwendig, die Funktionen in-vivo zu untersuchen, da nur hier relevante hämodynamische, humorale sowie mechanische Einflüsse zum Tragen kommen.

Um die embryonale Letalität der klassischen Knockout-Modelle zu umgehen, war es notwendig, konditionell Pkp2 und Dsp in adulten Mauserzen auszuschalten. So war es möglich, die Konsequenzen des Pkp2- bzw. Dsp-Verlustes für die Komponenten der Area composita und deren Bindungspartner zu untersuchen. Im Speziellen sollte die Frage geklärt werden, ob die Aufrechterhaltung der kardialen Zell-Zell-Kontakte, die intrazelluläre Verankerung des Zytoskeletts und somit die Struktur, Funktion und mechanische Belastbarkeit des Herzens beeinflusst werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Erzeugung von *Plakophilin-2*-defizienten Mauslinien

#### 2.1.1. Konstruktion des cPkp2-Targeting-Vektors

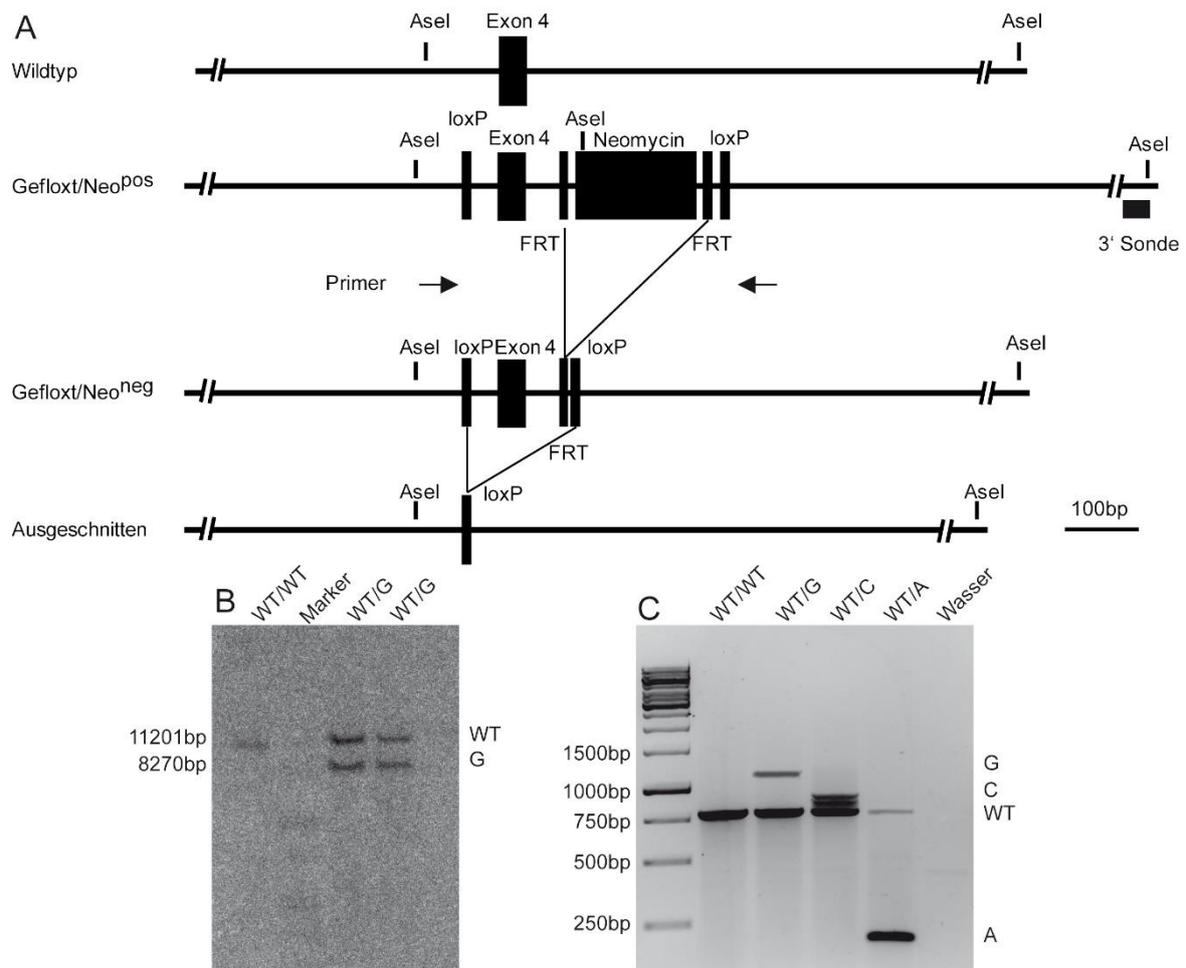
Zur Erzeugung von zeit- und gewebespezifischen Pkp2-defizienten Mauslinien wurde das Cre/loxP-System und die Technik der homologen Rekombination in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus angewandt. In der Maus existieren potentiell vier Pkp2-Spleißvarianten (ensembl-ID:ENSMUSG00000041957). Exon 4 ist das erste vollständig transkribierte Exon in allen Isoformen. Eine Exzision von Exon 4 führt in der Transkription zu einem Frameshift und zur Insertion verfrühter Stoppkodons. Dies hat den Abbruch der Translation und die Entstehung einer Pkp2-Nullmutation zur Folge. Daher wurde Exon 4 zusammen mit den angrenzenden 6299bp großen 5'- und 6721bp großen 3'-DNA-Sequenzen des wildtypischen C57BL/6-BAC-Klons RP23-463A2 subkloniert. Mithilfe der Rekombinierung-Technik wurden anschließend Cre-Erkennungssequenzen (loxP) 180bp 5' und 320bp 3' von Exon 4 eingefügt. Zusammen mit der 3'-loxP-Sequenz wurde eine Neomycin-Kassette zur Selektion rekombinierter ES-Zellen eingebracht (Abb.9A). Die Transfektion dieses cPkp2-Targeting-Vektors erfolgte in ES-Zellen des Ola129 Mausstammes.

#### 2.1.2. Analyse der transfizierten embryonalen Stammzellen

Die transfizierten ES-Zellklone (n=96) wurden mittels Southern-Blot-Technik auf eine erfolgreiche Rekombination des cPkp2-Targeting-Vektors überprüft. Eine zusätzlich mit der 3'-loxP-Neomycin-Kassette eingebrachte Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym AseI ermöglichte die Unterscheidung zwischen gerichteter und ungerichteter Rekombination des Targeting-Vektors. Rekombinierte der Targeting-Vektor ungerichtet ins ES-Zellgenom, war ausschließlich das Wildtyp-Allel (11201bp) detektierbar. Bei einer gerichteten Rekombination konnte aufgrund der eingebrachten AseI-Schnittstelle zusätzlich ein verkürztes Fragment (8270bp) nachgewiesen werden (Abb.9B). Zwei der sechs erfolgreich rekombinierten ES-Zell-Klone wurden in Blastozysten injiziert und in scheinsschwangere C57Bl/6 Ammenmäuse implantiert. Es entstanden 17 chimäre Nachkommen.

### 2.1.3. Generierung der konditionellen Pkp2-Knockout-Maus

Die chimären Nachkommen wurden mit C57Bl/6-Mäusen verpaart. Die Analyse des Genotyps der F1-Generation erfolgte mittels PCR (Abb.9C). Es wurden sieben heterozygote Nachkommen (n=103) mit dem Gefloxt/Neo<sup>pos</sup>-Allel geboren. Da die Neomycin-Kassette die wildtypische Expression von Pkp2 beeinträchtigen könnte, wurde diese aus der gDNA mithilfe des Flp/Frt-Systems entfernt. Hierzu wurden die Pkp2-Neo<sup>pos</sup>-Mäuse mit FLPdeleter-Mäusen (Rodriguez et al., 2000) verpaart und die Nachkommen hinsichtlich ihres Genotyps untersucht. Bei 9 von 76 Nachkommen wurde eine erfolgreiche Deletion der Neomycin-Kassette nachgewiesen. Mäuse mit einem gemischt-genetischen Hintergrund weisen häufig eine große phänotypische Variabilität auf. Daher wurden zur Vereinheitlichung des Hintergrunds die Neomycin-negativen cPkp2-Nachkommen über 5 Generationen mit C57Bl/6 Tieren zurückgekreuzt.



**Abbildung 9: Knockout-Schema und Genotypisierung.** (A) Schematische Darstellung der Pkp2-Allele (Wildtyp [WT], Gefloxt/Neo<sup>pos</sup> [G], Gefloxt/Neo<sup>neg</sup> [C] und Ausgeschnitten [A]) des klonierten Pkp2-DNA-Bereichs. (B) Southern-Blot-Analyse von transfizierten ES-Zellen mit der externen 3'-Sonde. (C) Genotypisierungs-PCR der Pkp2-Mäuse (WT, G, C, A).

## 2.2. Die Bedeutung von Plakophilin-2 für die embryonale Entwicklung

### 2.2.1. Embryonale Letalität nach ubiquitärer Deletion von Plakophilin-2

Im klassischen Pkp2-Knockoutmodell (kPkp2) zeigten die homozygoten, Pkp2-defizienten kPkp2<sup>-/-</sup>-Nachkommen eine Letalität am Embryonaltag 10,75 (E10.75). Die kPkp2<sup>-/-</sup>-Mausembryos wiesen infolge einer fehlerhaften Herzmorphogenese Rupturen der Herzwand und Blutakkumulationen in der Perikardialhöhle auf. Die Pkp2-Nullmutation im kPkp2-Mausmodell wurde durch Integration einer Neomycin-Kassette in Exon 1 generiert, was den Stopp der Translation nach 43 Aminosäuren verursacht (Grossmann et al., 2004). Dagegen induziert das Ausschneiden von Exon 4 einen Frameshift im cPkp2-Mausmodell. Dadurch wird ein Stoppkodon nach 85bp in Exon 5 etabliert, was zum Abbruch der Translation führt. Zum Vergleich des Phänotyps der kPkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem von ubiquitär deletierten cPkp2-Mäusen, wurden cPkp2-Mäuse mit CreDel-Mäusen verpaart. In diesen Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Zytomegalovirus Minimalpromotors in allen Geweben exprimiert (Schwenk et al., 1995). Die Pkp2-Deletion wird über die Keimbahn weitergegeben, wodurch Pkp2 Cre-unabhängig ab der F2-Generation konstitutiv ausgeschaltet ist (Del-cPkp2). Mäuse mit heterozygot deletiertem Pkp2 zeigten keine pathologischen Auffälligkeiten und eine normale Lebenserwartung.

Aus Verpaarungen zwischen Del-cPkp2<sup>+/-</sup>-Tieren entstanden keine lebenden homozygoten Del-cPkp2<sup>-/-</sup>-Nachkommen. Um den Zeitpunkt der embryonalen Letalität zu ermitteln, wurden Embryonen aus verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht (Tab.2). An E10.5 wiesen die Nachkommen eine genotypische Verteilung nach den Mendelschen Regeln auf, wobei die Del-cPkp2<sup>-/-</sup>-Embryos jedoch phänotypische Veränderungen zeigten. Lichtmikroskopisch wurden Blutansammlungen im Bauchraum, eine deutliche Reduzierung der Blutmenge in den Dottersackgefäßen und Blutakkumulationen in der Perikardialhöhle (Abb.10) beobachtet. Der Anteil vitaler Del-cPkp2<sup>-/-</sup>-Embryos war an E11.5 stark reduziert und konnte an E13.5 nicht nachgewiesen werden.

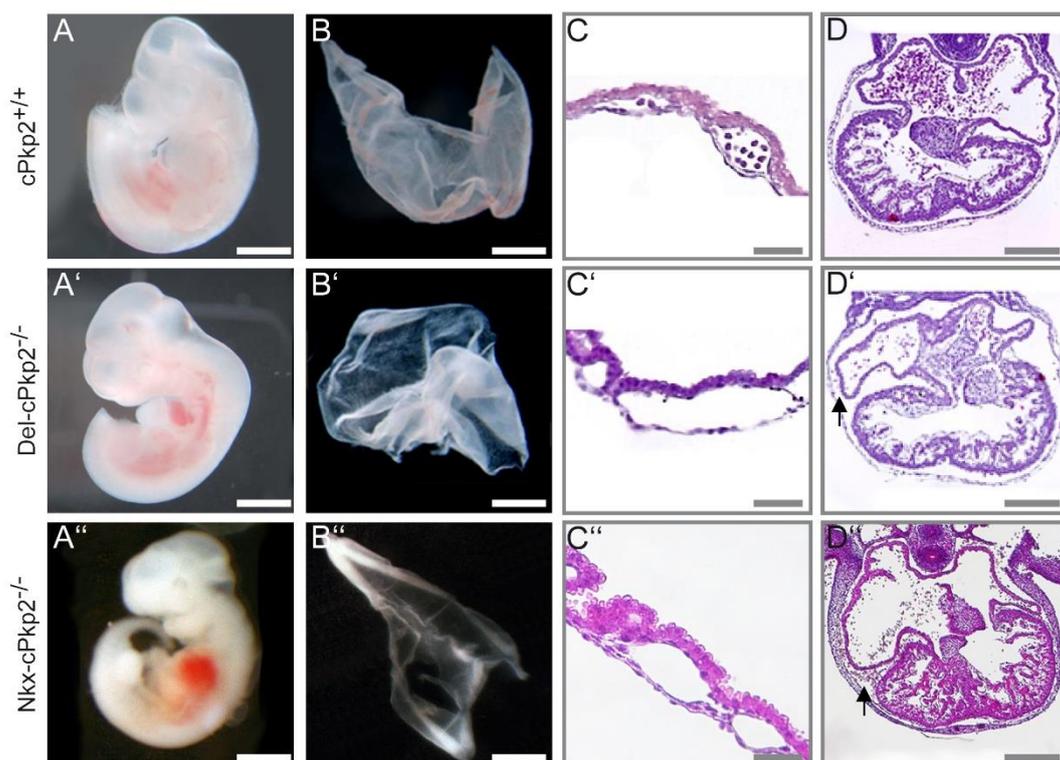
Alter	Del-cPkp2 <sup>+/+</sup>	Del-cPkp2 <sup>+/-</sup>	Del-cPkp2 <sup>-/-</sup>
E10.5	22% (7)	56% (15)	22% (6)
E11.5	37% (13)	45% (16)	8% (3)
E13.5	23% (5)	67% (10)	0% (0)

**Tabelle 2: Vitale Nachkommen von Del-cPkp2<sup>+/-</sup>-Verpaarungen.**  
Die Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der F1-Genotypen.

### 2.2.2. Herzspezifische Deletion von Plakophilin-2 führt zur embryonalen Letalität

Mäuse mit ubiquitär deletiertem Pkp2 zeigten deutliche kardiale Veränderungen. Diese Tatsache legt nahe, dass die herzspezifische Funktion von Pkp2 die embryonale Letalität der beiden konstitutiven Pkp2-Knockout-Modelle verursacht. Die Analyse der kardialen Pkp2-Funktion in der Embryonalentwicklung wurde durch Verpaarung der cPkp2-Mäuse mit Nkx2.5-Cre-Mäusen (Nkx-cPkp2) ermöglicht. Die Cre-Rekombinase steht in diesen Mäusen unter der Expressionskontrolle des NK2 Homeobox 5 Promotors (Nkx2.5). Nkx2.5 ist einer der frühesten Marker kardial determinierter Zellen und wird im Embryo ab E7.5 exprimiert (Moses et al., 2001). Dadurch wird Pkp2 in Cre-positiven Nkx-cPkp2-Mäusen herzspezifisch ab E7.5 ausgeschaltet.

Die phänotypisch nicht von ihren Wildtypgeschwistern unterscheidbaren Nkx-cPkp2<sup>+/-</sup>-Mäuse brachten, untereinander verpaart, keine lebenden Nkx-cPkp2<sup>-/-</sup>-Nachkommen hervor. Ebenso wie kPkp2<sup>-/-</sup>- und Del-cPkp2<sup>-/-</sup>-Embryos zeigten Nkx-cPkp2<sup>-/-</sup>-Embryos eine embryonale Letalität zwischen E10.5 und E11.5 sowie Blutansammlungen im Bauchraum, eine stark reduzierte Durchblutung der Dottersackgefäße und eine Blutakkumulation in der Perikardialhöhle (Abb.10).



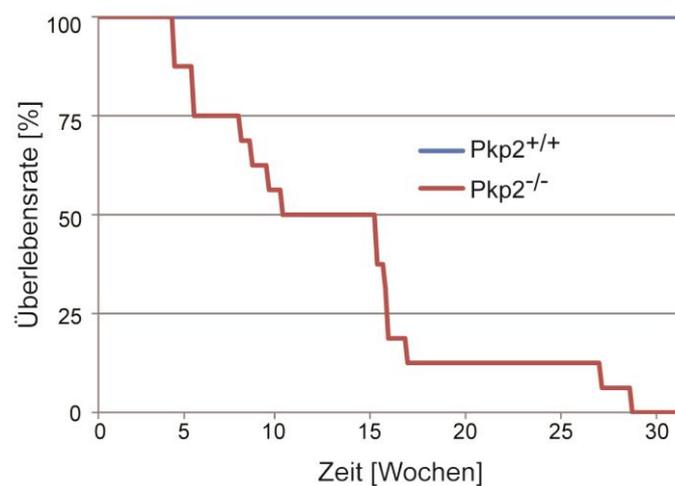
**Abbildung 10: Vergleich der Pkp2-deletierten Embryos an E10.5.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahme der Embryos. Größenbalken: 1mm. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme der Dottersäcke. Größenbalken: 1mm. (C) H&E gefärbte Schnitte vom Dottersack. Größenbalken: 100 $\mu$ m. (D) H&E gefärbte, transverse Schnitte embryonaler Herzen. Pfeile weisen auf Blutakkumulationen in der Perikardialhöhle hin. Größenbalken: 300 $\mu$ m. (A, B, C und D) Pkp2<sup>+/-</sup>-Embryo. (A', B', C' und D') ubiquitär deletierter Del-cPkp2<sup>-/-</sup>-Embryo. (A'', B'', C'' und D'') kardial deletierter Nkx-cPkp2<sup>-/-</sup>-Embryo.

### 2.3. Plakophilin-2 ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Funktion des adulten Mausherzens

Die vorangegangenen Experimente belegen die essenzielle Bedeutung von Pkp2 für die Herzentwicklung. Die Ausbildung kardialer Desmosomen wird jedoch erst spät, primär im postnatalen Stadium abgeschlossen. Aus diesem Grund ist es notwendig auch die Funktion von Pkp2 in adulten, differenzierten Kardiomyozyten zu untersuchen. Dazu wurden cPkp2-Mäuse mit MerCreMer-Mäusen verpaart. In diesen transgenen Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter der transkriptionellen Kontrolle des  $\alpha$ MHC (Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha) -Promotors exprimiert. Dieser wird von zwei mutierten Ligandenbindungsdomänen des Östrogenrezeptors flankiert und somit inaktiviert. Die Verabreichung des Östrogen-Antagonisten Tamoxifen führt zur herz- und zeitspezifischen Expression der Cre-Rekombinase (Sohal et al., 2001) und somit zur Deletion von Pkp2 (Pkp2<sup>-/-</sup>). Als Kontrolltiere wurden MerCreMer positive, cPkp2 homozygote Wurfgeschwister mit Öl, MerCreMer negative, cPkp2 homozygote Wurfgeschwister und MerCreMer positive, Pkp2-Wildtyp Mäuse mit Tamoxifen behandelt (cPkp2<sup>+/+</sup>).

#### 2.3.1. Ablation von Plakophilin-2 führt zur progressiven Herzinsuffizienz

Nach Induktion des Pkp2-Knockouts wurde die Überlebensrate der Versuchs- und Kontrolltiere (n=16) bestimmt. Im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren verstarben alle Pkp2-defizienten Mäuse innerhalb der ersten 28 Wochen, wobei über 85% bereits nach 16 Wochen tot waren (Abb.11). Die Herzfunktion der Mäuse wurde nach 14 (d14), 28 (d28) und 56 Tagen (d56) mittels Echokardiografie analysiert. Zu keinem Zeitpunkt waren die Herzfrequenz und das Schlagvolumen verändert. Die Wanddicke des



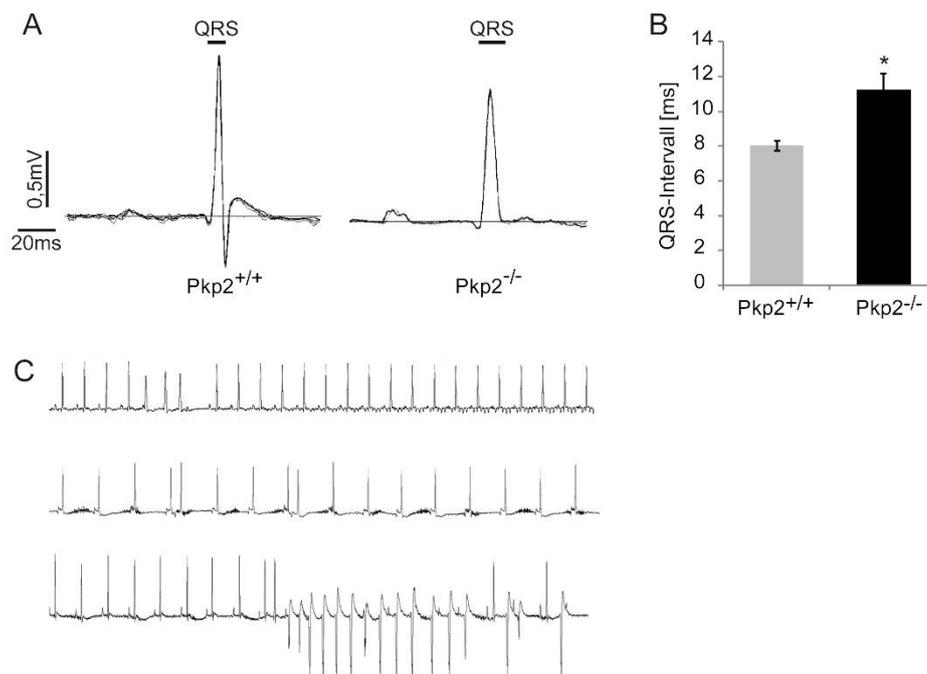
**Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve.** Anteil vitaler Pkp2<sup>+/+</sup>- (n=16) und Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse (n=16) in Wochen nach Beginn der Deletion von Pkp2

interventrikulären Septums zeigte dagegen nach 56 Tagen eine signifikante Vergrößerung (Pkp2<sup>+/+</sup>-d0 0,83±0,03mm; Pkp2<sup>-/-</sup>-d56 0,91±0,04mm; p<0,05). Eine Zunahme des linksventrikulären Diameters (Pkp2<sup>+/+</sup>-d0 3,73±0,07mm; Pkp2<sup>-/-</sup>-d14 4,73±0,15mm; p<0,001) konnte nach zwei Wochen beobachtet werden. Ebenso waren die Herzfunktionsparameter Ejektionsfraktion (Pkp2<sup>+/+</sup>-d0 57,65±2,30%; Pkp2<sup>-/-</sup>-d14 34,42±8,14%; p<0,05) und fraktionelle Faserverkürzung (Pkp2<sup>+/+</sup>-d0 30,90±1,44%; Pkp2<sup>-/-</sup>-d14 16,41±4,19%; p<0,01) deutlich reduziert. Das Herzzeitvolumen war nach zwei Wochen nicht verändert, zeigte jedoch nach vier Wochen eine deutliche Abnahme (Pkp2<sup>+/+</sup>-d0 14,08±0,85ml/min; Pkp2<sup>-/-</sup>-d28 9,58±0,92ml/min]; p<0,01) (Tab.3).

	Pkp2 <sup>+/+</sup> -d0	Pkp2 <sup>-/-</sup> -d14	Pkp2 <sup>-/-</sup> -d28	Pkp2 <sup>-/-</sup> -d56
HF [bpm]	522±15	505±40	472±29	495±11
IVS [mm]	0,83±0,03	0,76±0,04	0,70±0,04	0,91±0,04*
LVPW [mm]	0,84±0,04	0,74±0,05	0,70±0,04	0,92±0,07
LV [mm]	3,73±0,07	4,73±0,15***	4,77±0,14***	5,03±0,16***
FS [%]	30,90±1,44	16,41±4,19**	12,84±2,39***	10,42±2,09***
EF [%]	57,65±2,30	34,42±8,14*	28,22±4,72***	22,99±4,16**
SV [µl]	26,85±1,20	25,96±4,81	20,70±2,28	19,79±2,56
HZV [ml/min]	14,08±0,85	12,46±1,58	9,58±0,92**	9,81±1,30*

**Tabelle 3: Parameter der echokardiographischen Untersuchung.** Ermittelte Parameter (Mittelwert ± Standardfehler) der Pkp2<sup>+/+</sup>-Mäuse (d0) und der Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse an d14, d28 und d56 (n=6). Herzfrequenz (HF), Durchmesser des interventrikulären Septums (IVS), Durchmesser der linksventrikulären posterioren Wand (LVPW), Durchmesser der linken Ventrikels (LV), Fraktionelle Faserverkürzung (FS), Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV), Herzzeitvolumen (HZV). Statistik: Anova-Varianzanalysestest (\*, p<0,05, \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,001).

Elektrophysiologische Parameter wurden in den Versuchstieren nach 56 Tagen mittels Elektrokardiographie (EKG) untersucht. Da in Mäusen im Gegensatz zum Menschen die Repolarisation schon während der Depolarisation anderer Herzbereiche beginnt (London, 2001), konnten die Parameter QT-Intervall und ST-Strecke nicht analysiert werden. Die Herzrate (Pkp2<sup>+/+</sup> 408±23bpm; Pkp2<sup>-/-</sup>



**Abbildung 12: Verlängerte Reizweiterleitung und Arrhythmien.** (A) Repräsentative Darstellung der EKGs von Pkp2<sup>+/+</sup> und Pkp2<sup>-/-</sup>-Tieren. (B) Dauer des QRS-Intervalls von Pkp2<sup>+/+</sup> (n=5) und Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=5); Statistik: Student's T-Test (\*, p<0,05). (C) Beispiele spontaner Störungen des ventrikulären Rhythmus von Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäusen.

434±50bpm;  $p>0,05$ ), das PQ-Intervall (Pkp2<sup>+/+</sup> 38,94±2,09ms; Pkp2<sup>-/-</sup> 40,44±1,02ms;  $p>0,05$ ) und die Dauer der P-Welle (Pkp2<sup>+/+</sup> 17,27±1,64ms; Pkp2<sup>-/-</sup> 16,24±1,35ms;  $p>0,05$ ) der Versuchstiere entsprachen denen der Kontrollmäuse. Dagegen wurde in den Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäusen eine deutliche Verlängerung des QRS-Intervalls (Pkp2<sup>+/+</sup> 8,05±0,29ms; Pkp2<sup>-/-</sup> 11,24±0,98ms;  $p<0,05$ ) beobachtet. Zusätzlich zeigten die EKGs der Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse arrhythmogene Episoden wie nicht anhaltende Tachyarrhythmien und das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen (Abb.12).

### **2.3.2. Plakophilin-2 defiziente Mäuse zeigen Anzeichen für Myokardschäden, linksventrikuläre Hypertrophie, gesteigerte Fibrose und Aktivierung des fetalen Genprogramms**

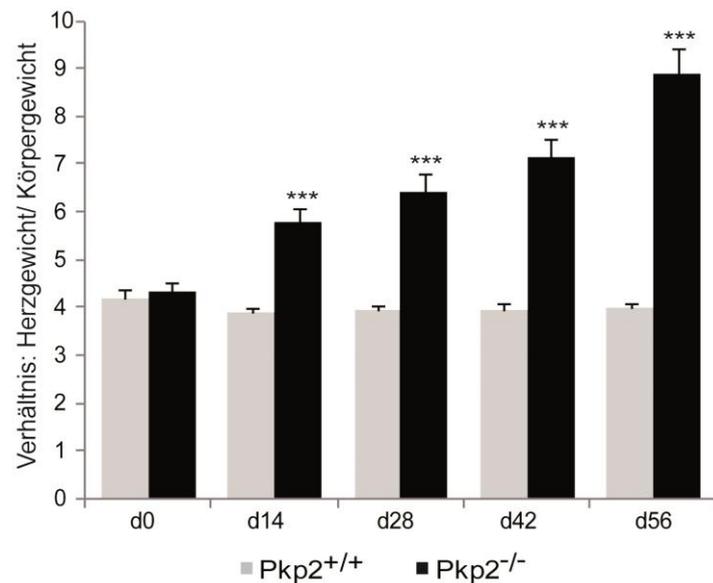
Die *in-vivo* Charakterisierung belegte die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, einer linksventrikulären Hypertrophie und einer verzögerten Reizweiterleitung in den Pkp2-defizienten Mäusen. Da die Herzinsuffizienz häufig mit einer Schädigung des Myokards assoziiert ist, wurden im Folgenden Parameter und Marker für eine Degradation der Kardiomyozyten analysiert.

#### *2.3.2.1. Kardiales Troponin-I ist im Serum von Plakophilin-2 defizienten Mäusen nachweisbar*

Zum Nachweis degradierender Kardiomyozyten können die dabei freigesetzten Proteine im Serum detektiert werden. Troponin-I, eine Untereinheit des an der Regulation der Kontraktion beteiligten Troponin-Komplexes, ist ein solcher Biomarker. Um das Auftreten von Myokardschäden in den Pkp2-deletierten Mäusen zu analysieren, wurde daher das Serum der Versuchstiere vor sowie 7 und 14 Tage nach Beginn der Pkp2-Deletion mittels des "Mouse Cardiac Tn-I"-Elisa-Assays auf kardiales Troponin-I untersucht. In Kontroll-Mäusen wurde zu keinem Zeitpunkt Troponin-I im Serum nachgewiesen. Dagegen enthielten die Seren von vier der fünf getesteten Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen 0,35±0,05 ng/ml kardiales Troponin-I. Der Tod von Zellen verläuft generell entweder über Apoptose oder über Nekrose. Beim pathologischen Untergang (Nekrose) der Zellen kommt es zur akuten Auflösung der Kern- und Zellmembran, was eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes verursacht. Bisher existiert jedoch kein direkter Nachweis für die Nekrose. Im Gegensatz dazu erfolgt während des physiologischen Zelltodes (Apoptose) eine kontrollierte Verstoffwechslung der Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes. Mithilfe des "ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit"-TUNEL-Assays lassen sich programmiert zugrunde gehende Zellen in Organschnitten direkt nachweisen. Die Untersuchung ergab allerdings keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen im Myokard zwischen Pkp2<sup>-/-</sup>- und Kontroll-Mäusen.

### 2.3.2.2. Plakophilin-2 defiziente Herzen weisen eine linksventrikuläre Hypertrophie und eine gesteigerte Fibrose auf

Die echokardiografischen Befunde zeigten eine hypertrophe Reaktion der Herzen der Knockout-Tiere. Da die Größe des Herzens ebenso von der Körpergröße abhängt, wurde das Herzgewicht der Versuchstiere auf das Körpergewicht normalisiert. Basal (Pkp2<sup>+/+</sup> 4,17±0,22; Pkp2<sup>-/-</sup> 4,33±0,22, p>0,05) unterschied sich dieses Verhältnis nicht zwischen den Versuchstiergruppen. Im Verlauf der Zeit, d14 (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,91±0,10; Pkp2<sup>-/-</sup> 5,76±0,30, p<0,001), d28 (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,97±0,08; Pkp2<sup>-/-</sup> 6,43±0,39, p<0,001), d42 (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,96±0,08; Pkp2<sup>-/-</sup> 7,14±0,41, p<0,001), d56 (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,99±0,12; Pkp2<sup>-/-</sup> 8,90±0,54, p<0,001) nahm das Herzgewicht der Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse im Verhältnis zum Körpergewicht signifikant zu (Abb.13).



**Abbildung 13: Anstieg des Herz-/Körpergewichtsverhältnisses.** Verhältnis des Herz-/Körpergewichts an d0, d14, d28, d42 und d56 (n=8 je Analysezeitpunkt). Statistik: Anova-Varianzanalysestest (\*\*\*, p<0,001).

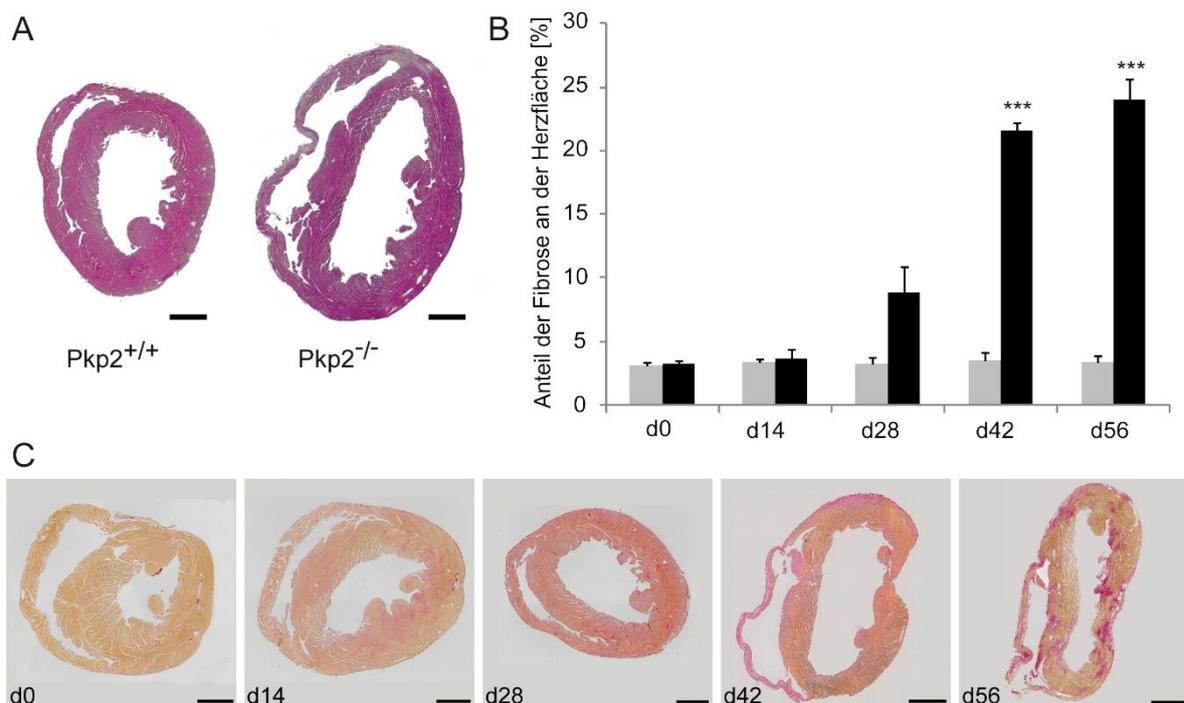
In Abb.14A ist repräsentativ die deutliche Vergrößerung der Herzflächen von Pkp2-defizienten Mäusen sowie eine Dilatation der rechten Ventrikel in Hämatoxylin&Eosin (H&E) gefärbten Präparaten visualisiert. Die Gewichtszunahme der Herzen könnte unterschiedliche Ursachen haben: eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, eine Zunahme an fibrotischem Material oder Einlagerungen von Fettgewebe bzw. Kalziumpräzipitaten.

Als Anpassung an eine pathologische Mehrbelastung vergrößern sich Herzzellen. Dies wurde durch Messung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten untersucht. Vor Beginn der Pkp2-Deletion (Pkp2<sup>+/+</sup> 174,0±7,3µm<sup>2</sup>; Pkp2<sup>-/-</sup> 195,8±12,1µm<sup>2</sup>; p>0,05) unterschieden sich die Zellgrößen der Versuchstiergruppen nicht voneinander. Nach der Induktion des Pkp2-Knockouts, d14 (Pkp2<sup>+/+</sup> 179,4±9,2µm<sup>2</sup>; Pkp2<sup>-/-</sup> 293,2±16,4µm<sup>2</sup>; p<0,001), d28 (Pkp2<sup>+/+</sup> 181,4±11,5µm<sup>2</sup>; Pkp2<sup>-/-</sup> 353,2±19,8µm<sup>2</sup>; p<0,001), d42 (Pkp2<sup>+/+</sup> 192,2±13,2µm<sup>2</sup>; Pkp2<sup>-/-</sup> 341,3±22,0µm<sup>2</sup>; p<0,001), d56 (Pkp2<sup>+/+</sup> 188,7±15,1µm<sup>2</sup>; Pkp2<sup>-/-</sup> 315,9±23,6µm<sup>2</sup>; p<0,001), wiesen die Kardiomyozyten der Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren eine signifikante Vergrößerung auf.

Das Mammaliaherz verfügt nicht über die Fähigkeit der Regeneration. Der Verlust von Kardiomyozyten kann deshalb nur durch einen Ersatz, z.B. fibrotisches Material, kompensiert werden. Des Weiteren ist

eine Herzinsuffizienz häufig mit einer pathologischen Fibrose vergesellschaftet. Mittels Sirius-Red Färbung wurde der fibrotische Anteil an der Gesamtherzfläche quantitativ ermittelt. Basal (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,12±0,26%; Pkp2<sup>-/-</sup> 3,28±0,26%; p>0,05) sowie zwei (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,33±0,28%; Pkp2<sup>-/-</sup> 3,65±0,70%; p>0,05) und vier (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,24±0,45%; Pkp2<sup>-/-</sup> 8,88±2,08%; p>0,05) Wochen nach Beginn der Pkp2-Deletion wurde kein deutlicher Unterschied im Fibroseanteil festgestellt. Nach sechs (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,53±0,58%; Pkp2<sup>-/-</sup> 21,55±0,61%; p<0,001) und nach acht Wochen (Pkp2<sup>+/+</sup> 3,34±0,49%; Pkp2<sup>-/-</sup> 24,03±1,66%; p<0,001) wiesen die Pkp2-defizienten Mäuse jedoch einen signifikant erhöhten Anteil an Fibrose auf (Abb.14B).

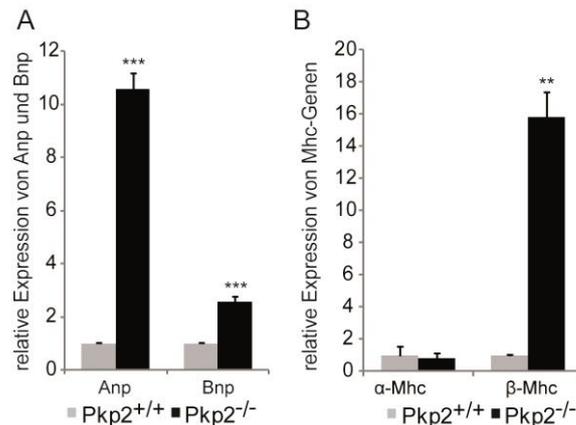
Mäuse mit herzspezifisch, embryonal ausgeschaltetem Dsp (Garcia-Gras et al., 2006) weisen eine Infiltration von Fettzellen im Myokard auf. Das Vorhandensein von Fettgewebe in cPkp2<sup>-/-</sup>-Herzen wurde mit der Oil-Red-O-Färbung überprüft. Zu keinem Zeitpunkt konnten dabei gespeicherte Triglyceride im Myokard nachgewiesen werden. In Mäusen, die Dsg2 als dominant-negatives bzw. mutiertes Allel exprimieren, sind große Myokardareale kalzifiziert (Krusche et al., 2011) (Pilichou et al., 2009). Die Analyse erfolgte mit der Alizarin-Red-S Färbung, jedoch enthielten die Versuchstierherzen zu keinem Zeitpunkt Kalziumpräzipitate.



**Abbildung 14: Anstieg der Fibrose im zeitlichen Verlauf. (A)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen H&E gefärbter Herzschnitte von Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>-Tieren nach 8 Wochen. Größenbalken: 1mm. **(B)** Fibroseanteil der Herzfläche der Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen an d0, d14, d28, d42 und d56. Statistik: Anova-Varianzanalysestest (\*\*\*, p<0,001). **(C)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen Sirius-Red-S gefärbter Herzschnitte von Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen an d0, d14, d28, d42 und d56. Größenbalken: 1mm.

### 2.3.2.3. Deletion von Plakophilin-2 führt zur Aktivierung des fetalen Genprogramms

Kennzeichen für eine kardiale Hypertrophie ist eine erhöhte Expression der mRNA der fetalen schweren Kette von Myosin (Mhc) (Izumo et al., 1987; Mahdavi et al., 1984) und der natriuretischen Peptide A und B (Anp und Bnp) (Gardner et al., 2007). Die mRNA-Expression von Anp ( $10,6 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$ ), Bnp ( $2,6 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ) (Abb.15A) und des fetalen  $\beta$ -Mhc ( $15,8 \pm 1,6$ ,  $p < 0,01$ ) war in den  $Pkp2^{-/-}$ -Herzen im Gegensatz zum adulten  $\alpha$ -Mhc ( $0,8 \pm 0,4$ ,  $p > 0,05$ ) nach acht Wochen signifikant erhöht (Abb.15B).

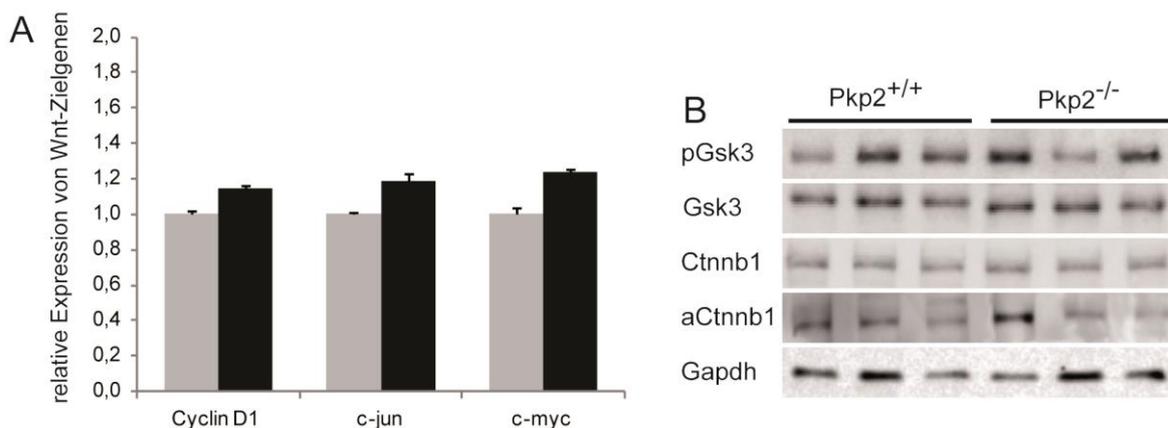


**Abbildung 15: Aktivierung des fetalen Genprogramms. (A)** Relative mRNA-Expression von Anp und Bnp normalisiert auf Gapdh von  $Pkp2^{+/+}$ - (n=5) und  $Pkp2^{-/-}$ -d56-Mäusen (n=5). **(B)** Relativen mRNA-Expression von  $\alpha$ -Mhc und  $\beta$ -Mhc normalisiert auf Gapdh von  $Pkp2^{+/+}$  (n=5) und  $Pkp2^{-/-}$ -d56-Mäusen (n=5). Statistik: und Student's T-Test (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 2.4. Der kanonische Wnt-Signalweg ist nicht verändert

Garcia-Gras et. al postulierten die Beteiligung des kanonischen  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalwegs an der ARVC-Pathogenese. Im inaktiven Zustand bindet ein Proteinkomplex, bestehend aus Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Axin-1 und Adenomatous Polyposis Coli (APC), an  $\beta$ -Catenin (CTNNB1). CTNNB1 kann dabei von GSK3 an Serin33 und Serin37 phosphoryliert werden, was zu dessen Degradation führt. Bindet ein WNT-Ligand an den Frizzled-Rezeptor, wird der kanonische  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalweg und dessen Effektorprotein Dishevelled (DSH) aktiviert. DSH inhibiert den GSK3-Axin-1-APC-Komplex, wodurch aktives CTNNB1 (aCTNNB1) im Zytoplasma stabilisiert wird. Ein Teil des CTNNB1-Pools kann anschließend in den Zellkern translozieren, wo es mit Proteinen der Transkriptionsfaktor- (TCF) und Lymphoid-Enhancer-Binding-Faktor (LEF)-Familien interagiert. Dies induziert die Expression von Wnt-Zielgenen, wie beispielsweise das Jun-Proto-Onkogen (c-JUN), Cyclin-D1 und das Avian Myelocytomatosis Viral Onkogen Homolog (c-MYC) (Li et al., 2011b; Sakanaka, 2002). Garcia-Gras et. al spekulierten, dass Mutationen in den ARVC-Genen zur Störung der Desmosomenformation führen. Dadurch könnte PG in den Zellkern einwandern, wo es aufgrund seiner zu CTNNB1 kompetitiven Funktion den kanonischen  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalweg supprimiert.

Um einen Einfluss dieses Signalwegs in Pkp2-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden Experimente von Garcia-Gras et al. rekapituliert. Dazu wurde die mRNA-Expression der WNT-Zielgene mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) und die Proteinexpression der am kanonischen  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalweg beteiligten Proteine mit Western-Blot-Analysen analysiert. Nach acht Wochen zeigten jedoch die Wnt-Zielgene CyclinD1, c-jun und c-myc keine veränderte Expression (Abb.16A). Ebenso konnte in den Herzen der Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse kein Unterschied der Proteinexpression von Gsk3, pGsk3, Ctnnb1 und aCtnnb1 im Vergleich zu den Kontroll-Hezen festgestellt werden (Abb.16B). Zusätzlich wurde eine mögliche Lokalisation von Pg und Ctnnb1 in den Zellkern mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert, jedoch konnte kein nukleäres Pg bzw. Ctnnb1 nachgewiesen werden.



**Abbildung 16: Der kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist nicht verändert. (A)** Relativen mRNA-Expression von CyclinD1, c-jun und c-myc von Pkp2<sup>+/+</sup> (n=5) und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56 (n=5) Mäusen. Statistik: Student's T-Test. **(B)** Proteinexpression der am kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin beteiligten Proteine pGsk3, Gsk3,  $\beta$ -Catenin (Ctnnb1) und aktivem  $\beta$ -Catenin (aCtnnb1) im Vergleich zur Ladekontrolle Gapdh in Pkp2<sup>+/+</sup> und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Hezen.

## 2.5. Desmosomale Desintegration in Plakophilin-2 defizienten Mausherzen

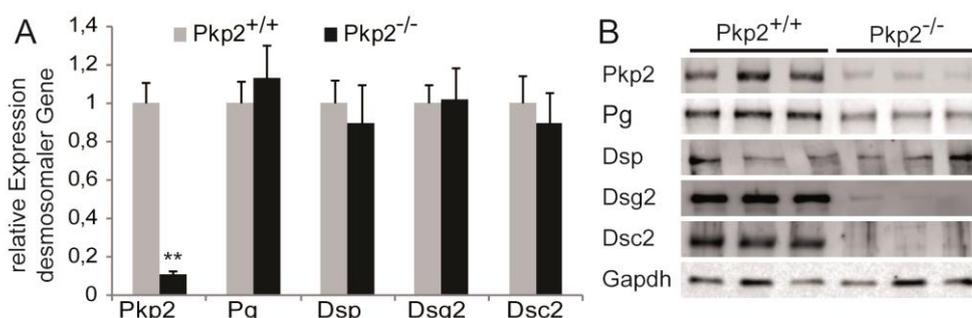
Die Analyse der Expression von wichtigen am kanonischen  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalweg beteiligten Proteinen und von Wnt-Zielgenen deutete darauf hin, dass dieser Mechanismus nicht an der Pathogenese der Pkp2-defizienten Mäuse beteiligt ist. Pkp2 ist ein essenzieller Bestandteil der Desmosomen und spielt bei deren Zusammenbau eine entscheidende Rolle. So bindet Pkp2 Dsp und die Protein-Kinase-C- $\alpha$ , was zu einer Phosphorylierung von Serin2849 von Dsp führt. Dies ermöglicht die Integration von Dsp und die assoziierten Intermediärfilamente in das Desmosom (Bass-Zubek et al., 2008). Wir spekulieren daher, dass eine Ablation von Pkp2 in einer gestörten Einbindung von Dsp ins Desmosom resultiert, wodurch die Verknüpfung der Intermediärfilamente mit den Glanzstreifen gehemmt wird. Dies könnte zum Verlust der Desmosomenfunktion und zu einer Störung der Übertragung der Kontraktionskraft führen.

### 2.5.1. Plakophilin-2 wird effizient deletiert und resultiert nicht in einer kompensatorischen Expression von Plakophilin-1 oder -3

Aufgrund der Induktion der Cre-Rekombinase mittels intraperitonealer Injektion von Tamoxifen könnte die Effizienz der Pkp2-Deletion variieren. Zur vollständigen Pkp2-Ablation in den Kardiomyozyten erhielten die Versuchstiere daher Tamoxifen über zwei Wochen. Die Expression von Pkp2 wurde anschließend mittels qPCR und densitometrischer Auswertung von Western-Blot-Analysen untersucht. Obwohl bei der RNA- und Proteinisolierung aus Herzgewebe nicht ausschließlich das Vorhandensein von Pkp2 in Kardiomyozyten analysiert werden konnte, reduzierte sich sowohl die mRNA- als auch die Protein-Expression in den d56-Knockout-Mäusen um 90% (Abb.17). Bereits 14 Tage nach Beginn der Induktion des Knockouts wurde eine genauso stark verminderte mRNA- und Protein-Expression in den Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen beobachtet (Daten werden nicht gezeigt). Zeitgleich konnte Pkp2 in Immunfluoreszenz-Färbungen nicht an den Glanzstreifen nachgewiesen werden. Die Funktion von Pkp2 könnte durch eine gesteigerte Expression anderer Mitglieder der Plakophilinfamilie (Pkp1 bzw. Pkp3) kompensiert werden. Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene konnten jedoch diese Gene in den Herzlysaten detektiert werden.

### 2.5.2. Die Expression der desmosomalen Proteine Plakoglobin, Desmoglein-2 und Desmocollin-2 ist reduziert

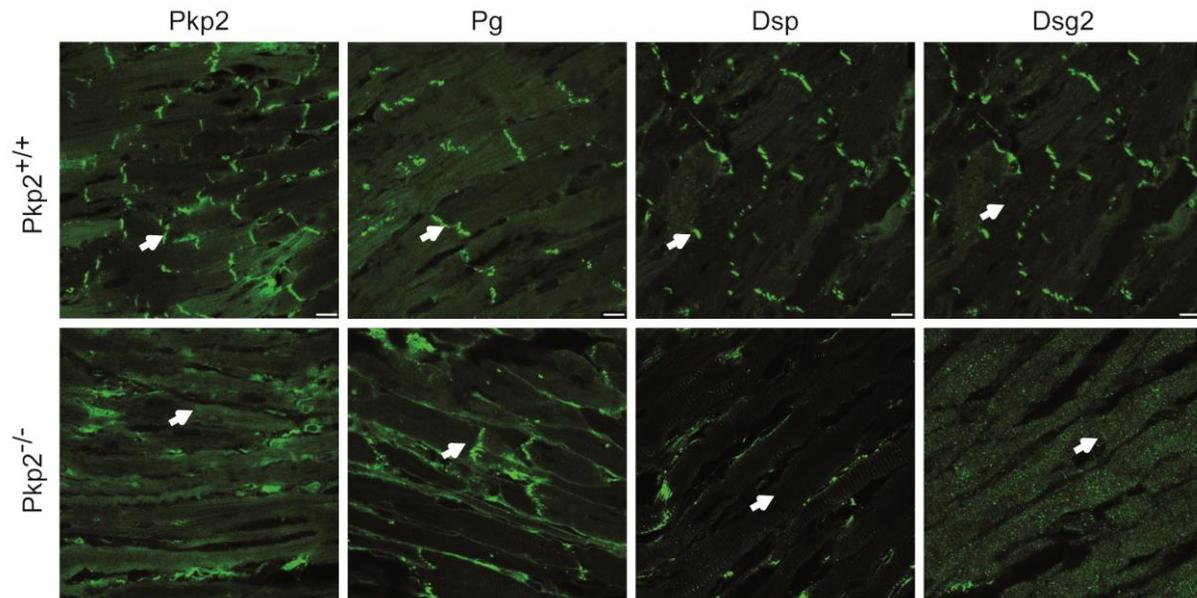
In Mäusen mit deletiertem Pg wurde eine reduzierte Expression von Pkp2, Dsp und Dsg2 beobachtet (Li et al., 2011a; Li et al., 2011b). Aufgrund dieser Tatsache und der Wichtigkeit von Pkp2 für den Zusammenbau der Desmosomen vermuteten wir, dass Dsp, Pg, Dsg2 und Dsc2 in Pkp2-defizienten Mäusen geringer exprimiert werden als in der Kontrollgruppe. Die mRNA-Expression dieser Gene wies allerdings keinen Unterschied zwischen den Gruppen auf (Abb.17A). Auch auf Proteinebene zeigte Dsp die gleiche Expressivität. Dagegen ergab die densitometrische Analyse der Western-Blot-Versuche eine signifikante Reduktion von PG um 65%, von Dsg2 um 95% und von Dsc2 um 99% (Abb.17B).



**Abbildung 17: Reduzierte Protein-Expression der desmosomalen Komponenten. (A)** Relative mRNA-Expression der desmosomalen Gene Pkp2, Pg, Dsp, Dsg2 und Dsc2 normalisiert mit Gapdh in Pkp2<sup>+/+</sup>- (n=5) und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Herzen (n=5). Statistik: Student's T-Test (\*\* p<0,01). **(B)** Proteinexpression der desmosomalen Proteine Pkp2, Pg, Dsp, Dsg2 und Dsc2 im Vergleich zur Ladekontrolle Gapdh in Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Mäusen.

### 2.5.3. Desmoglein-2 lokalisiert nicht an die Glanzstreifen Pkp2-defizienter Herzen

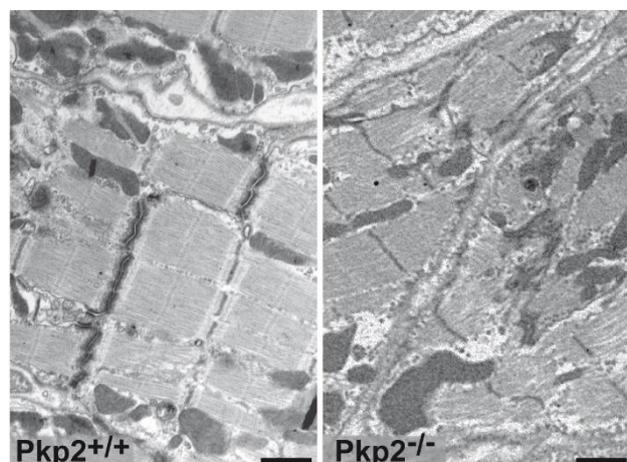
Um die reduzierte Expression der einzelnen Proteine auf Desmosomenebene zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abb.18). Allerdings war für Dsc2 für diese Anwendung kein funktionsfähiger Antikörper erhältlich. Im Gegensatz zu Pg konnte eine Lokalisation von Dsp und Dsg2 an den Glanzstreifen Pkp2-defizienter Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: Delokalisation desmosomaler Proteine.** Repräsentative konfokale Aufnahmen der desmosomalen Proteine Pkp2, Pg, Dsp und Dsg2 an den Glanzstreifen (Pfeile) in Herzschnitten von Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>d56-Mäusen. Größenbalken: 10µm.

### 2.5.4. Der Knockout von Plakophilin-2 führt zu einer verminderten Desmosomenzahl

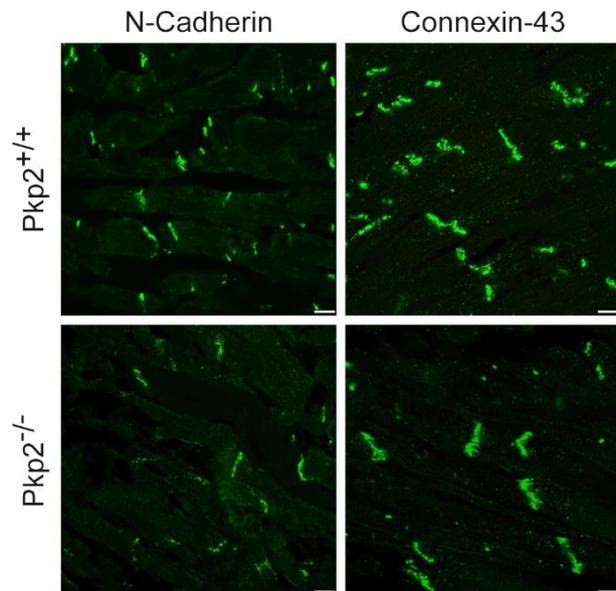
Die strukturelle Auswirkung der reduzierten Protein-Expression wurde mittels Elektronenmikroskopie von jeweils drei Herzen untersucht. In ultradünnen Schnitten von Pkp2<sup>+/+</sup>-Herzen waren die kontrastreichen, desmosomalen Strukturen an den Glanzstreifen gut zu erkennen und die Sarkomere wiesen eine reguläre Anordnung auf. Dagegen zeigten Pkp2<sup>-/-</sup>d56-Hezen eine sehr stark verminderte Desmosomenanzahl, so dass eine quantitative Auswertung der Desmosomenlänge und -breite sowie der Spaltbreite nicht möglich war. Zusätzlich war die Sarkomerstruktur in Pkp2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten desorganisiert (Abb.19), obwohl kein deutlicher Unterschied in deren Länge (Pkp<sup>+/+</sup> 1594±21nm; Pkp2<sup>-/-</sup> 1539±12nm; p>0,05) gemessen wurde.



**Abbildung 19: Desmosomale Desintegration.** Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen ultradünner Schnitte der Glanzstreifen. Größenbalken: 1µm.

### 2.5.5. Gap-Junctions und Adhärenz-Verbindungen sind in Pkp2-Knockout-Mäusen nicht verändert

Ob die Desintegration der Desmosomen eine Veränderung der an den Glanzstreifen benachbarten Adhärenzverbindungen und Gap-Junctions zur Folge hat, wurde mittels Expressions- und Lokalisationsuntersuchungen wichtiger Vertreter dieser Zell-Zellverbindungen überprüft. Das Transmembranprotein N-Cadherin ist einer der wesentlichsten Bestandteile der kardialen Adhärenzverbindungen und vermittelt den Zell-Zell-Kontakt. Gap-Junctions werden in ventrikulären Kardiomyozyten hauptsächlich aus Connexin-43 gebildet. In Immunfluoreszenz- (Abb.20), Western-Blot- und quantitativen real-time PCR-Analysen konnte weder in der Expression noch in der Lokalisation dieser Proteine ein Unterschied festgestellt werden.

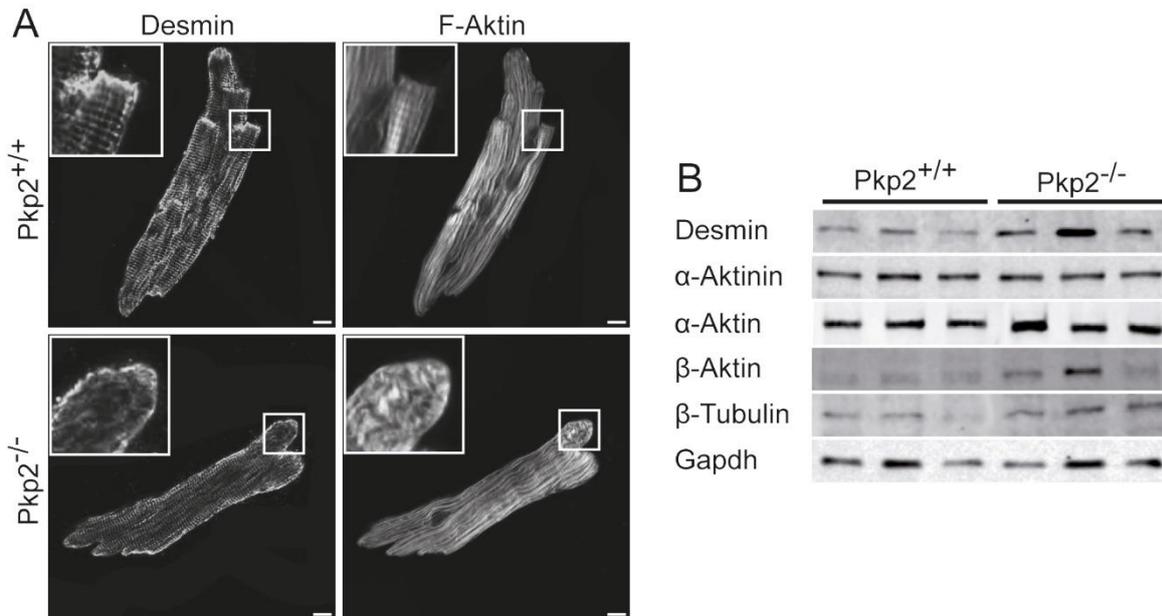


**Abbildung 20: Nicht-desmosomale Zell-Zellverbindungen sind unverändert.** Repräsentative konfokale Aufnahmen von N-Cadherin und Connexin-43 in gefrorenen Herzschnitten aus Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Mäusen. Größenbalken: 10µm.

### 2.6. Plakophilin-2-defiziente Kardiomyozyten zeigen eine Veränderung der Intermediärfilamente, des Aktin- sowie des mikrotubulären Zytoskeletts und eine Beeinträchtigung lateraler Zelladhäsionsstrukturen

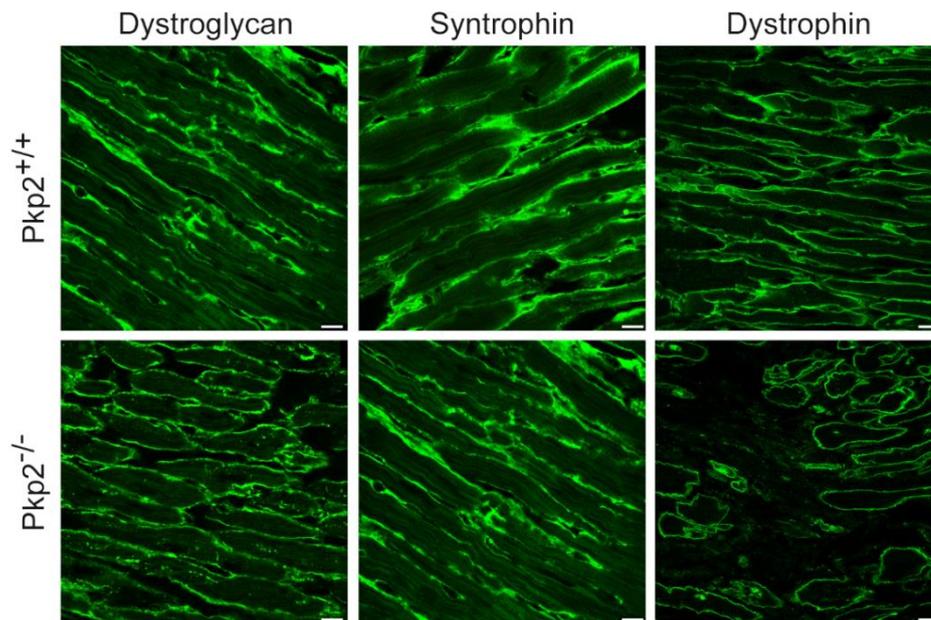
Die Intermediärfilamente (IF) der Kardiomyozyten werden ans Desmosom über Pkp2 und der PRD-Domäne von Dsp verknüpft. Im Herz besteht das intermediäre Zytoskelett hauptsächlich aus dem Typ-3-IF Desmin. Zusammen mit den mikrotubulären Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sowie dem Aktinfilament  $\beta$ -Aktin formt Desmin ein Netzwerk zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität. Dabei bewahrt dieses zytoskelettale Netzwerk die räumliche Anordnung der Sarkomere zum Nukleus, zur lateralen Zellmembran und zu anderen wichtigen Organellen (Goldfarb and Dalakas, 2009). Die Auswirkungen der Pkp2-Deletion auf das Sarkomer und das Zytoskelett wurden mit Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert. Um die Morphologie der Einzelkardiomyozyten zu überprüfen wurden die Herzen enzymatisch verdaut. Aus Pkp2-defizienten Herzen (n=5) wurden signifikant weniger native Kardiomyozyten als aus Kontrollherzen (n=5) isoliert (Pkp2<sup>+/+</sup> 50.600±9.700 Zellen/ml; Pkp2<sup>-/-</sup> 10.000±1.000 Zellen/ml; p<0,01). Bei der mikroskopischen Beurteilung fiel auf, dass Pkp2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten im Gegensatz zur Kontrollgruppe abgerundete terminale Enden aufwiesen.

Die angrenzenden, zytosolischen Bereiche der  $Pkp2^{-/-}$ -Zellen zeigten ein stark reduziertes Desmin-Signal und desorganisierte Aktinfilamente (Abb.21A). Auf mRNA-Ebene waren Desmin,  $\beta$ -Aktin,  $\beta$ -Tubulin,  $\alpha$ -Aktin und  $\alpha$ -Aktinin in beiden Gruppen gleich exprimiert. Während die Proteinexpression der Sarkomerproteine  $\alpha$ -Aktin und  $\alpha$ -Aktinin unverändert war, konnten jedoch deutlich erhöhte Expressionen der nicht-sarkomeren, zytoskelettalen Bestandteile Desmin,  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Tubulin in  $Pkp2^{-/-}$ -Herzen beobachtet werden (Abb.21B).



**Abbildung 21: Veränderungen der Intermediärfilamente und des Zytoskeletts. (A)** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Desmin und F-Aktin in isolierten Kardiomyozyten aus  $Pkp2^{+/+}$ - und  $Pkp2^{-/-}$ d56-Mäusen. Größenbalken: 20 $\mu$ m. **(B)** Expression der zytoskelettalen Proteine Desmin,  $\alpha$ -Aktinin,  $\alpha$ -Aktin,  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Tubulin im Vergleich zur Ladekontrolle Gapdh in  $Pkp2^{+/+}$ - und  $Pkp2^{-/-}$ d56-Mauserherzen.

Während Desmin in der longitudinalen Achse mit dem Desmosom verbunden ist, stellt es lateral über Desmuslin, Syncoilin und Dystrobrevin die Verbindung mit dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC) her (Kumarapeli and Wang, 2004). Es wird vermutet, dass die Verknüpfung der extrazellulären Matrix (EM) mit dem Intermediär- und dem Aktinfilamentsystem durch den DGC die Zellmembran vor Kontraktionsschäden bewahrt (Petrof et al., 1993). Unter der Annahme, dass die Veränderungen des IF-Systems Auswirkungen auf laterale Adhäsionsmoleküle haben, wurden die DGC-Proteine Dystrophin, Syntrophin und Dystroglycan überprüft. Das 427kDa große Dystrophin verknüpft über Linkerproteine Desmin und über die aminoternale Aktin-Binde-Domäne F-Aktin mit dem Transmembranprotein Dystroglycan. Über dessen 156kDa große extrazelluläre Domäne ist der DGC mit der EM assoziiert. Syntrophin ist direkt mit der S-Domäne von Dystrophin verbunden und fungiert als Adapter zu Ionenkanälen (Gee et al., 1998) und Kinasen (Hogan et al., 2001). Dystroglycan und Syntrophin wiesen in beiden Versuchstiergruppen eine unveränderte Expression und Lokalisation auf. Im Gegensatz zu Kontrollherzen wurden dagegen in konfokalen Aufnahmen von  $Pkp2^{-/-}$ d56-Herzschnitten wesentlich mehr Zellen mit einem stark reduzierten Dystrophin-Signal beobachtet (Abb.22). In Western-Blot- und real-time PCR-Versuchen wurde kein Unterschied der Dystrophin-Expression detektiert.



**Abbildung 22: Expression der Komponenten des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes.** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Dystroglycan, Syntrophin und Dystrophin in gefrorenen Herzschnitten aus Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>d56-Mäusen. Größenbalken: 10µm.

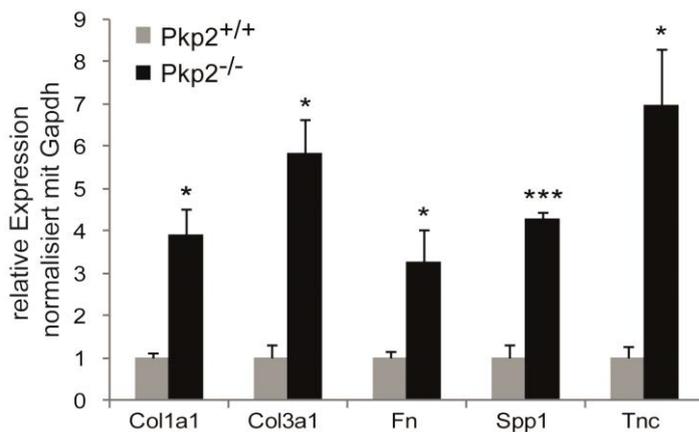
## 2.7. Plakophilin-2 Deletion führt zur Aktivierung kardialer Schutzmechanismen

Die Veränderung des Zytoskeletts deutet auf eine wesentliche Einschränkung der Kardiomyozytenfunktion hin. Dieses überträgt im Herzen die an den Sarkomeren produzierte Kontraktionskraft in longitudinaler Richtung an die Glanzstreifen. Gleichzeitig verteilt das Zytoskelett die Zellverkürzung gleichmäßig an die laterale Membran. Eine Störung dieses Gleichgewichtes könnte somit zu einem vermehrten Auftreten von Scherkräften führen. Zurzeit existiert keine Methode um diese Kräfte direkt nachzuweisen. Als indirekte Nachweismethode könnte jedoch die Analyse kompensatorischer Schutzmechanismen verwendet werden. Wir spekulieren, dass infolge einer gestörten Ableitung der Kontraktionskraft Membranrupturen mit einer erhöhten Frequenz auftreten könnten. Kardiomyozyten sind in der Lage dies mittels des Membranreparaturmechanismus zu kompensieren. Des Weiteren bilden Zellen unter Belastung Hitzeschockproteine, die den programmierten Zelltod inhibieren, Proteine vor Degradation schützen und den Abbau nicht funktionsfähiger Proteine beschleunigen. Der protektive Ilk/Akt-Signalweg könnte aufgrund der progressiven Fibrose in den Pkp2<sup>-/-</sup>-Mausherzen aktiviert sein.

### 2.7.1. In Plakophilin-2-defizienten Herzen ist der Ilk/Akt-Signalweg aktiviert

Eine erhöhte Expression von EM-Proteinen verändert die Bindung der damit assoziierten Vertreter der Integrin-Rezeptor-Familie. Infolgedessen kommt es zu einer Konformationsänderung der Integrin-Komplexe. Dadurch kann die 59kDa große Integrin linked kinase (ILK) an eine bisher nicht

identifizierte Bindungsstelle des intrazellulären  $\beta$ 1-Integrins binden, was die Ilk aktiviert. Unter anderem phosphoryliert ILK die Proteinkinase v-akt murine thymoma viral oncogene (AKT) an Serin473 (pAkt), den omnipräsenten Knotenpunkt von pathologischem Kardiomyozytenstress (Wickstrom et al., 2010). Dies induziert zelluläre Überlebensprozesse, wie z.B. die Inhibition der Apoptose, die Umstellung des Metabolismus zum kompensatorischen Zellwachstum, die Modifikation zellulärer Strukturen zum Schutz der Kontraktilität und die Aktivierung regenerativer Mechanismen (Sussman et al., 2011). Die gesteigerte Expression von EM-Bestandteilen wurde mittels quantitativer real-time PCR und die Aktivierung des Ilk/Akt-Signalwegs durch Western-Blot-Analysen überprüft. In



**Abbildung 23: Überexpression der Integrin-Liganden.** Relative mRNA-Expression der Integrin-Liganden Kollagen1a1 (Col1a1), Kollagen3a1 (Col3a1), Fibronectin (Fn), Spp1 Osteopontin (Spp1) und Tenascin (Tnc) normalisiert mit Gapdh in Pkp2<sup>+/+</sup>- (n=4) und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Herzen (n=4). Statistik: Student's T-Test (\*  $\bar{u}$ <0,05; \*\*\*

Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen war die mRNA-Expression der wichtigsten kardialen EM-Proteine Kollagen1a1 ( $3,91 \pm 0,61$ ,  $p < 0,05$ ), Kollagen3a1 ( $5,82 \pm 0,82$ ,  $p < 0,05$ ), Fibronectin ( $3,82 \pm 0,73$ ,  $p < 0,05$ ), Osteopontin ( $4,29 \pm 0,14$ ,  $p < 0,001$ ) und Tenascin ( $6,97 \pm 1,34$ ,  $p < 0,05$ ) signifikant erhöht (Abb.23). Gleichzeitig wiesen Pkp2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten eine deutlich höhere Expression von Ilk und pAkt bei unveränderter Gesamt-Akt-Expression auf (Abb.24).

### 2.7.2. Erhöhte Expression von protektiven Hitzeschockproteinen in Plakophilin-2-defizienten Herzen

Ein Zielgen von pAKT ist das Hitzeschockprotein (HSP) HSP27 (Kostenko and Moens, 2009). Im Zusammenspiel mit anderen protektiven HSPs ist dies ein weiterer kardialer Schutzmechanismus, der die Integrität der Zelle durch Stabilisierung von Proteinen zum Schutz vor Degradation, Beschleunigung des Abbaus nicht funktionsfähiger Proteine und Inhibition der Apoptose schützt (Chi and Karliner, 2004). Die Analyse der Expression verschiedener Hsps sollte zeigen, ob dieser Mechanismus durch die Deletion von Pkp2 angeschaltet wurde. Eine Überexpression von HSP27 und Crystallin, Alpha B (CRYAB) inhibiert die Apoptose und Nekrose (Martin et al., 1997; Ray et al., 2001), wobei die Phosphorylierung von CRYAB an Serin59 (pCRYAB) den Effekt maximiert (Morrison et al., 2003). HSP27 bindet unphosphoryliert an F-Aktin und inhibiert dessen weitere Polymerisation (Benndorf et al., 1994). Phosphoryliert kann pHSP27 nicht mehr an F-Aktin binden, wodurch dieses verstärkt polymerisiert. Die Überexpression des vorwiegend mitochondrialen Proteins HSP60 bewahrt die Aktivität von Komplex III und IV in den Mitochondrien zur Erholung des ATP-Spiegels (Lin et al.,

2001). Innerhalb eines Multiproteinkomplexes reguliert das ATP-abhängige HSP90 die Faltung und Aktivierung einer Vielzahl von Substratproteinen (Richter and Buchner, 2001). Unter anderem löst sich stress-induziert Hsp90 vom Transkriptionsfaktor Heat Shock Faktor 1, der die Expression von HSPs reguliert (Guo et al., 2001). Rattenkardiomyozyten werden durch eine Überexpression von Hsp90 vor pathologischem Stress geschützt ((Brar et al., 2002; Stephanou et al., 1998). Hsp70 schützt Zellen vor ischämischen (Su et al., 1999) und oxidativen Stress (Su et al., 1998) unter anderem durch Inhibierung der inflammatorischen Mediatoren pJnk, Tnf $\alpha$  und des Nfkb-Signalwegs (Chung et al., 2008; Park et al., 2001; Senf et al., 2008). Western-Blot-Analysen zeigten in Pkp2<sup>-/-</sup>-Mausherzen eine deutlich höhere Expression von Hsp25, Hsp60, Hsp70 und Hsp90 sowie eine verstärkte Phosphorylierung von Hsp25 (pHsp25) und Cryab (pCryab) (Abb.24A).

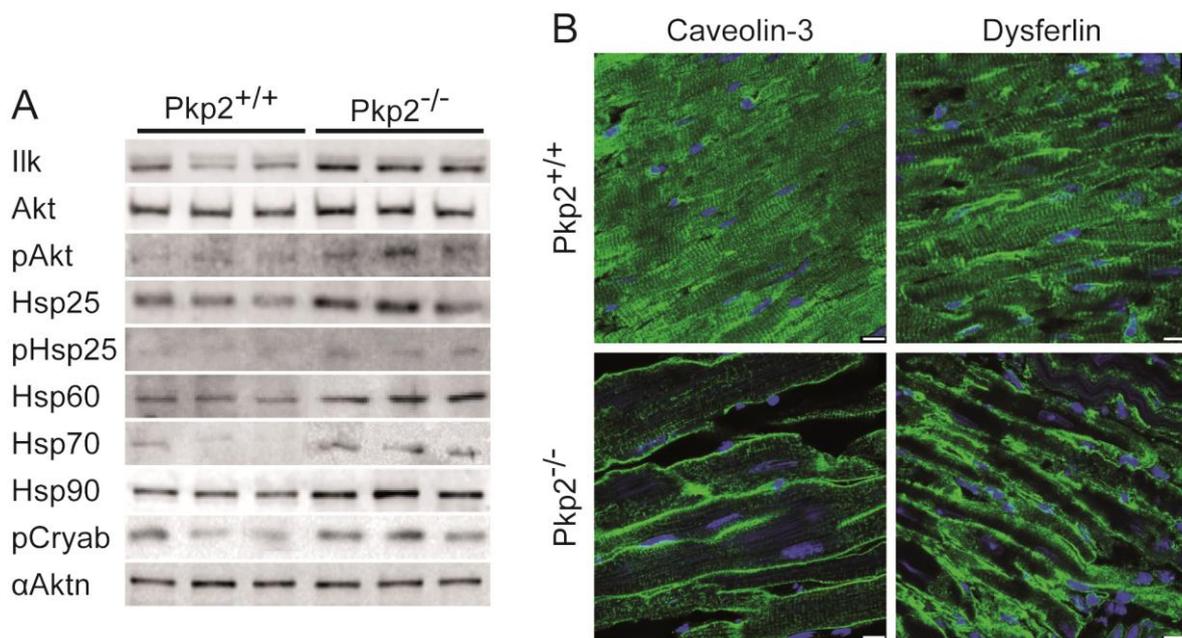
### **2.7.3. Plakophilin-2-Ablation führt zur Aktivierung der Membranreparatur**

Die Modifikation des IF-Systems und der Verlust des Dystrophin-Signals in Pkp2-defizienten Kardiomyozyten führten zu der Hypothese, dass die laterale Ableitung der Kontraktionskraft gestört ist. Die möglicherweise daraus resultierende höhere Frequenz von Membranrupturen könnte durch Aktivierung des Membranreparatursystems kompensiert werden. Zentrales Protein in diesem Mechanismus ist das zur Ferlin-Familie gehörende Dysferlin. Das infolge einer Membranruptur einströmende Kalzium bindet an die C2-Domänen von Dysferlin und vermittelt so eine Membranfusion von Vesikeln an der Stelle des Rupturereignisses (Han and Campbell, 2007). Basal lokalisiert Dysferlin an die Zellmembran und an zytoplasmatische Vesikel. Nach dessen Aktivierung ist eine erhöhte Expression von Dysferlin an die Zellmembran nachweisbar. Dysferlin bindet an eine bisher nicht spezifizierte Domäne von Caveolin-3, das wichtigste Strukturprotein bei der Formation von Caveolea (Sinha et al., 2011). Diese bilden unter anderem ein Membranreservoir für die Membranreparatur. Zur Überprüfung, ob der Verlust des Dystrophin-Signals die Aktivierung der Membranreparatur zur Folge hat, wurden Herzschnitte von je fünf Mäusen immunhistologisch mit Antikörpern gegen Dysferlin und Caveolin-3 gefärbt. In Pkp2<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten zeigten diese eine deutlich stärkere Expression an der Zellmembran als in der Kontrollgruppe (Abb.24B). Die mRNA- und Protein-Expression war dagegen in den Versuchstiergruppen nicht verändert.

## **2.8. Deletion von Plakophilin-2 führt zum Verlust der Membranintegrität**

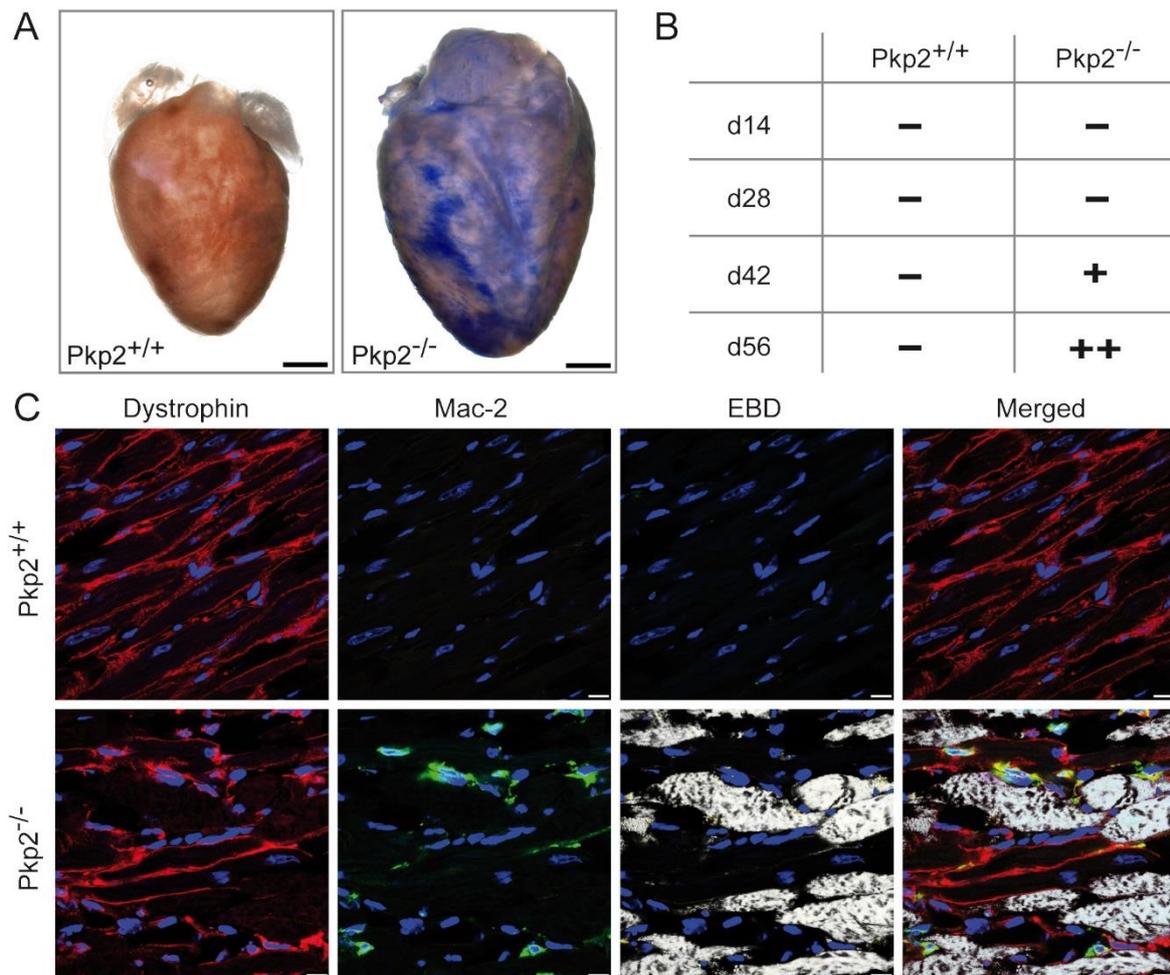
Der Verlust von Dystrophin und die Aktivierung der Zellmembranreparatur in Pkp2 defizienten Mausherzen wiesen auf eine Störung der Membranintegrität hin. Um reparierte Membranrupturen nachzuweisen wurde Evans Blue Dye (EBD) eingesetzt. EBD bindet seröses Albumin und kann dadurch nicht die Membran intakter Zellen passieren. Infolge von Rupturen gelangt EBD ins Zytoplasma und

akkumuliert dort möglicherweise nach erfolgter Reparatur. Um dies zu untersuchen erhielten die Versuchstiere 14, 28, 42 und 56 Tage nach Beginn der Pkp2-Deletion EBD. Mittels Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen wurde der Anteil EBD-positiver Zellen analysiert. In den Kontrollherzen und in Pkp2<sup>-/-</sup>d14- und d28-Herzen wurden nur wenige Zellen mit akkumuliertem EBD detektiert. Nach sechs und acht Wochen wiesen dagegen Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse im gesamten Herz einen deutlich erhöhten Anteil EBD-positiver Zellen auf (Abb.25A/B). Immunfluoreszenz-Analysen mit einer Co-Färbung von Dystrophin zeigten, dass ausschließlich in EBD-positiven Kardiomyozyten das Dystrophin-Signal stark reduziert war.



**Abbildung 24: Aktivierung kardialer Schutzmechanismen. (A)** Proteinexpression von Ilk, Akt, pAkt, Hsp25, pHsp25, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und pCryab im Vergleich zur Ladekontrolle  $\alpha$ -Aktinin ( $\alpha$ Aktn) in Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>d56-Mäusen. **(B)** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Caveolin-3 und Dysferlin (grün) gefärbten gefrorenen Herzschnitten aus Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>d56-Mäusen. Größenbalken: 10 $\mu$ m. Dapi (blau).

Wir spekulieren, dass das Membranreparatursystem die fortwährende Belastung und die daraus resultierenden Rupturen nicht kompensieren kann, was zum Tod der Kardiomyozyten führt. Da in Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen kein Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet wurde, ist Nekrose der wahrscheinliche Zelltodmechanismus. Dieser lässt sich jedoch bisher nicht direkt nachweisen. Nekrose induziert jedoch die Infiltration von Makrophagen in das Gewebe zur Beseitigung der Zellreste. Daher dienen Immunfluoreszenz-Analysen mit dem Makrophagen-Marker Mac-2 als indirekter Nachweis für das Vorkommen von Phagozytose. Die Abb.25C zeigt, dass die EBD-positiven, Dystrophin-negativen Zellen von mononukleären Zellen umgeben waren, die zu einem großen Teil aus Makrophagen bestanden.



**Abbildung 25: Verlust der Membranintegrität.** (A) Repräsentative Hellfeldaufnahmen EBD-behandelter Pkp2<sup>+/+</sup>- und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Herzen. Größenbalken: 1mm. (B) Anteil der EBD-positiven Kardiomyozyten zu den Zeitpunkten d14, d28, d42 und d56 ("-" gering; "+" hoch; "++" sehr hoch) (C) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Dystrophin (rot), Mac-2 (grün) und EBD (weiß) gefärbten gefrorenen Herzschnitten von Pkp2<sup>+/+</sup> und Pkp2<sup>-/-</sup>-d56-Mäusen. Größenbalken: 10µm. Dapi (blau).

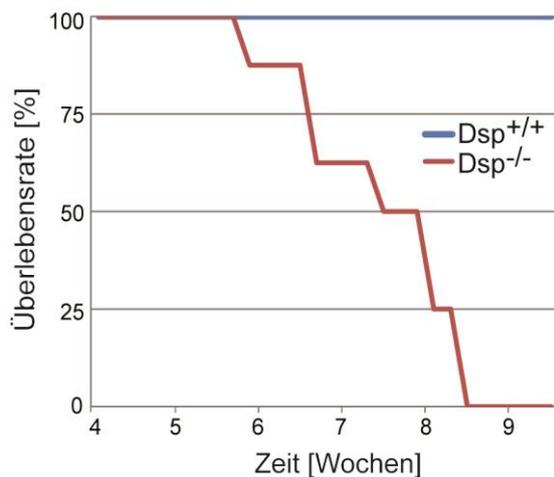
## 2.9. Der Phänotyp von Desmoplakin-defizienten Mauserherzen zeigt

### Übereinstimmungen mit denen der kardial-deletierten Plakophilin-2-Mäuse

Die vorangegangenen Ergebnisse belegen die essenzielle Funktion von Pkp2 im adulten Mauserherz. Jedoch lassen die Daten keine direkten Rückschlüsse zu, welche der phänotypischen Veränderungen direkt auf den Verlust von Pkp2 und welche primär aufgrund der Desintegration der Desmosomen zurückzuführen sind. Wir denken, dass ein phänotypischer Vergleich der Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einer herzspezifischen Deletion eines weiteren desmosomalen Gens diese Frage beantworten kann. Aus diesem Grund wurden konditionelle Dsp-Mäuse (Vasioukhin et al., 2001) mit MerCreMer-Mäusen verpaart. Die Analyse der Dsp-Funktion im adulten Herzen erfolgte mittels Tamoxifen-Injektion in 12 Wochen alten cDsp homozygoten, MerCreMer positiven Mäusen (Dsp<sup>-/-</sup>).

### 2.9.1. Ablation von Desmoplakin führt zur progressiven Herzinsuffizienz

Analog zu den Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden die Dsp-Versuchstiere mittels Echokardiografie, EKG, einer Troponin-I-Elisa-Analyse, histologischen Färbungen und quantitativen real-time PCR- sowie Western-Blot-Analysen auf Entwicklung einer progressiven Herzinsuffizienz, Fibrose und Aktivierung des fetalen Genprogramms untersucht. Zunächst fiel jedoch auf, dass die Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich eher



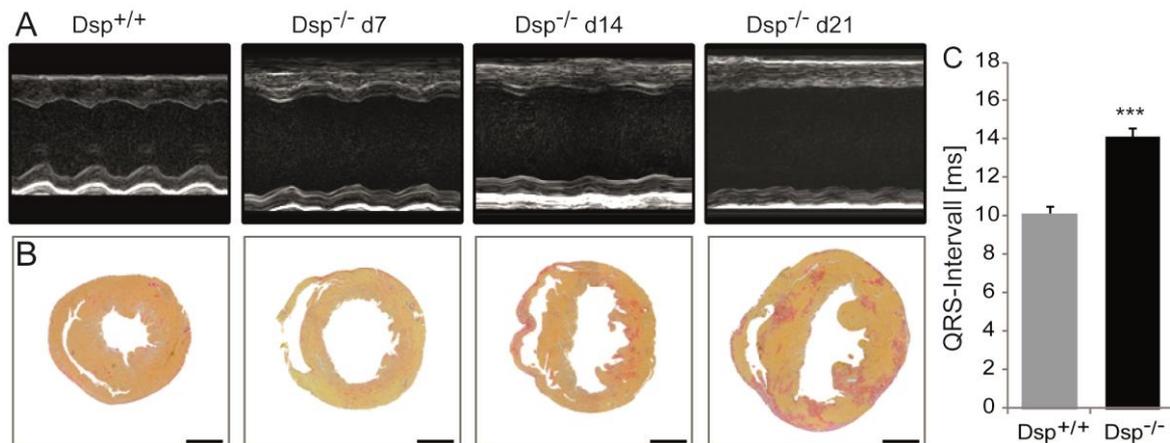
**Abbildung 26: Kaplan-Meier-Überlebenskurve.** Anteil lebender Dsp<sup>+/+</sup>- (n=16) und Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse (n=16) in Wochen nach Beginn der Dsp-Deletion.

verstarben als Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse. Innerhalb der ersten acht Wochen waren im Gegensatz zu den Kontrolltieren (Dsp<sup>+/+</sup>) alle Dsp-defizienten Mäuse gestorben (Abb.26). Gleichzeitig wurden die Versuchstiere echokardiografisch nach 7 (d7), 14 (d14) und 21 (d21) Tagen nach Beginn der Dsp-Deletion analysiert (Tab.Anhang1). Zu keinem Zeitpunkt wurde ein Unterschied der Herzrate, der Wanddicken der linksventrikulären posterioren Wand sowie des interventrikulären Septums detektiert. 14 Tage nach Beginn der Dsp-Deletion stieg der linksventrikuläre Durchmesser der Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich an (Dsp<sup>+/+</sup> 4,21±0,14mm; Dsp<sup>-/-</sup> 5,03±0,15mm; p<0,01). Bereits an d7 waren die

Herzfunktionsparameter Ejektionsfraktion (Dsp<sup>+/+</sup> 51,0±4,7%; Dsp<sup>-/-</sup> 30,0±4,6%; p<0,01) und fraktionelle Faserverkürzung (Dsp<sup>+/+</sup> 25,9±2,9%; Dsp<sup>-/-</sup> 14,3±2,3%; p<0,05) signifikant reduziert. Das Herzzeitvolumen (Dsp<sup>+/+</sup> 13,4±1,0ml/min; Dsp<sup>-/-</sup> 11,0±1,0ml/min; p<0,01) und das Schlagvolumen (Dsp<sup>+/+</sup> 26,4±2,4µl; Dsp<sup>-/-</sup> 21,8±2,6µl; p<0,05) unterschieden sich erst nach 21 Tagen signifikant.

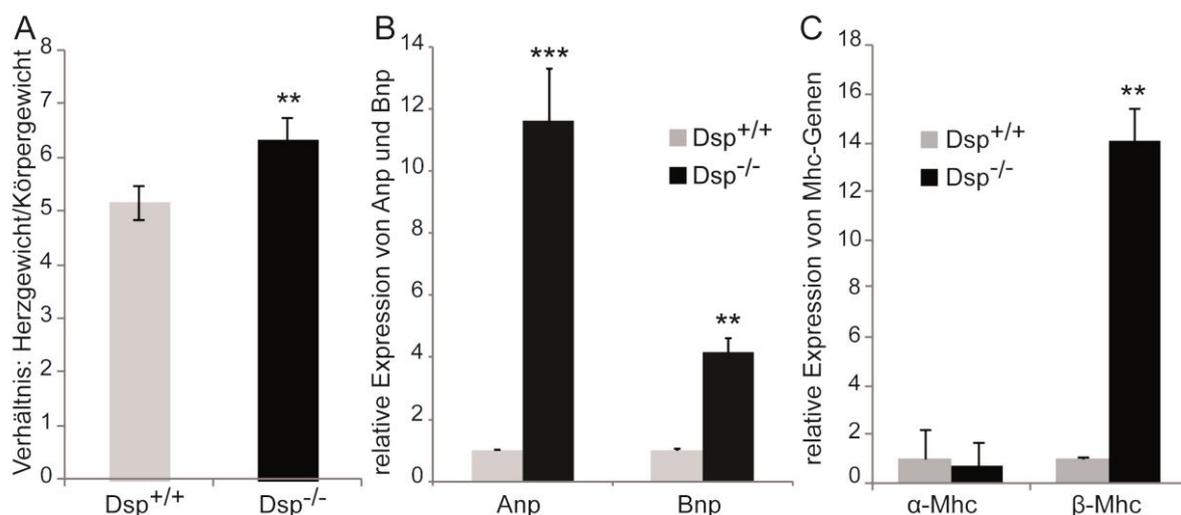
Korrespondierende, repräsentative Hellfeldaufnahmen Sirius-Red gefärbter Herzschnitte demonstrieren die progressive Zunahme der Fibrose in Dsp<sup>-/-</sup>-Mäusen. Der Fibroseanteil an der Gesamtherzfläche war an d14 signifikant erhöht (Dsp<sup>+/+</sup> 5,5±0,4µl; Dsp<sup>-/-</sup> 10,1±1,2µl; p<0,05) (Abb.27B). Die EKG-Analyse von Dsp<sup>-/-</sup>-d14-Mäusen zeigte keine Veränderung der Herzrate (Dsp<sup>+/+</sup> 245±16bpm; Dsp<sup>-/-</sup> 503±31bpm; p>0,05) und des PQ-Intervalls (Dsp<sup>+/+</sup> 40,0±1,1ms; Dsp<sup>-/-</sup> 37,8±0,5ms; p>0,05). Dagegen wurden signifikante Verlängerungen der Dauer der P-Welle (Dsp<sup>+/+</sup> 15,1±0,1ms; Dsp<sup>-/-</sup> 16,1±0,2ms; p<0,01) und des QRS-Intervalls beobachtet (Dsp<sup>+/+</sup> 10,1±0,4ms; Dsp<sup>-/-</sup> 14,1±0,5ms; p<0,001) (Abb.27C).

Wie die Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden die Dsp-defizienten Mäuse auf kardiales Troponin-I untersucht, um degradierende Kardiomyozyten nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren enthielt das Serum von allen Dsp<sup>-/-</sup>-d21-Mäusen (n=4) 0,12±0,03ng/ml kardiales Troponin I. Gespeicherte Triglyceride, Kalziumpräzipitate oder eine Zunahme der Apoptose wurden in den Dsp-Knockout-Herzen ebenfalls nicht beobachtet.



**Abbildung 27: Echokardiographie, Fibrose und QRS-Intervall.** (A) Repräsentative echokardiographische Aufnahmen (M-Mode) des linken Ventrikels von Kontroll- und Dsp<sup>-/-</sup>-Mäusen. (B) Repräsentative, transversale Herzschnitte gefärbt mit Sirius-Red. Größenbalken: 1mm. (C) Dauer des QRS-Intervalls von Dsp<sup>+/+</sup> (n=5) und Dsp<sup>-/-</sup>d14-Tieren (n=5). Statistik: Student's T-Test (\*\*\*) p<0,001).

Um eine Hypertrophie der Dsp<sup>-/-</sup>-Herzen zu analysieren wurde das Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht bestimmt. An d21 lag der Koeffizient in Dsp<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich höher als der Wert der Kontrollgruppe (Dsp<sup>+/+</sup> 5,2±0,2; Dsp<sup>-/-</sup> 6,3±0,2; p<0,01) (Abb.28A). Zum gleichen Zeitpunkt war die durchschnittliche Querschnittsfläche der Dsp<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten wesentlich vergrößert (Dsp<sup>+/+</sup> 197,0±8,1µm<sup>2</sup>; Dsp<sup>-/-</sup> 354,4±31,6µm<sup>2</sup>; p<0,001). Während die mRNA-Expression der adulten Mhc-Isoform (α-Mhc) unverändert war, zeigten Dsp<sup>-/-</sup>-Herzen eine signifikant erhöhte relative mRNA-Expression von Anp (11,6±0,8; p<0,01), Bnp (4,2±0,2; p<0,001) und β-Mhc (14,1±0,6; p<0,01) (Abb.28B/C).

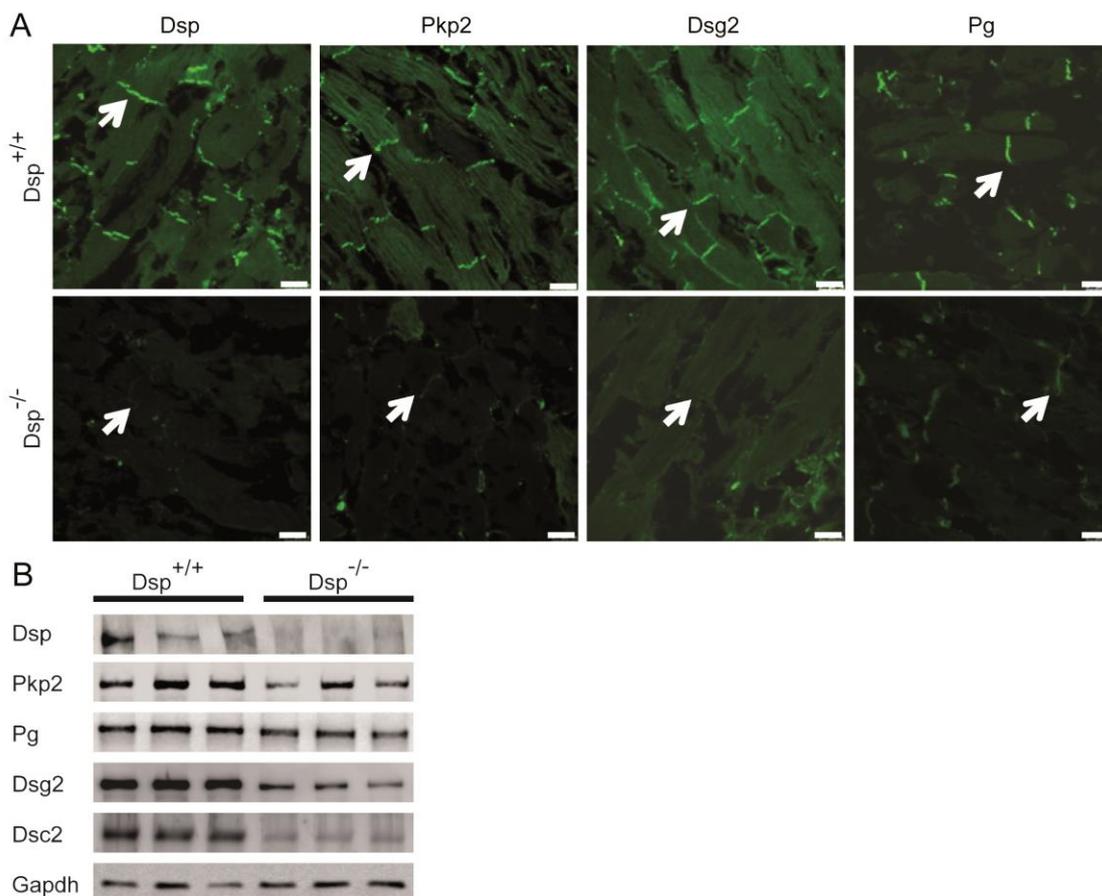


**Abbildung 28: Herz-/Körpergewicht-Verhältnis und Fetales Genprogramm.** (A) Quantifizierung des Verhältnisses des Herzgewichts zum Körpergewicht von Dsp<sup>+/+</sup> (n=8) und Dsp<sup>-/-</sup>d21-Mäusen (n=8). (B) Relative mRNA-Expression von Anp und Bnp sowie (C) von α-Mhc und β-Mhc von Dsp<sup>+/+</sup> (n=5) und Dsp<sup>-/-</sup>d21-Herzen (n=5) normalisiert mit Gapdh. Statistik: Student's T-Test (\*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001).

### 2.9.2. Keine Veränderung des kanonischen $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalwegs und desmosomale Desintegration

Über die Beteiligung des kanonischen  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalwegs wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während in *Pkp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Veränderung dieses Signalwegs festgestellt wurde, ist dieser in embryonal, herzspezifisch deletierten *Dsp*-Mäusen supprimiert (Garcia-Gras et al., 2006). Um zu überprüfen, ob eine Suppression des kanonischen  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalwegs auch in adulten, herzspezifisch deletierten *Dsp*-defizienten Herzen nachweisbar ist, wurden die in der Literatur beschriebenen Kennzeichen analog zum *Pkp2*-Versuch untersucht. In *Dsp*<sup>-/-</sup>d21-Hezen war die mRNA-Expression der Wnt-Zielgene CyclinD1, c-jun und c-myc nicht verändert. Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Proteinexpression von Gsk3, pGsk3, Ctnnb1 und aCtnnb1 in beiden Versuchstiergruppen gleich war.

Daraufhin überprüften wir die Hypothese, dass die Deletion von *Dsp* in differenzierten Kardiomyozyten zum Verlust der Desmosomenfunktion führt. Dazu wurde die Expression und Lokalisation wichtiger desmosomaler Proteine mittels quantitativer real-time PCR, Immunfluoreszenz und Western-Blot



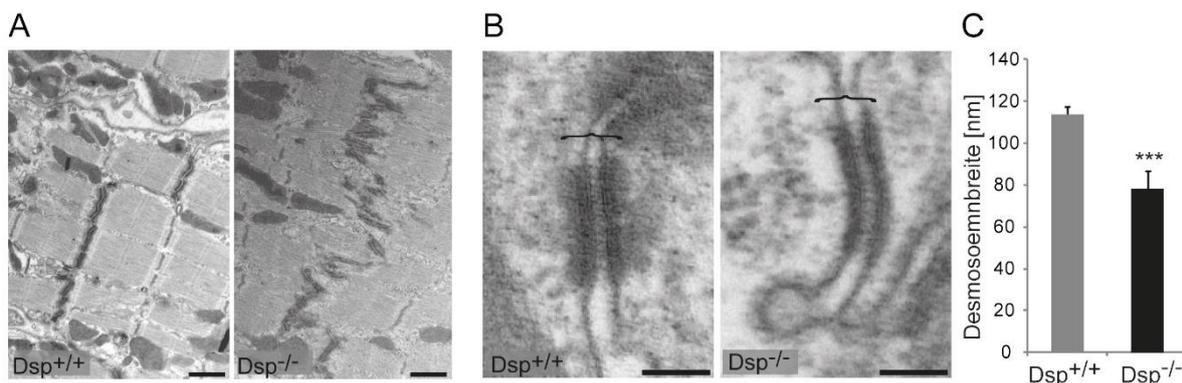
**Abbildung 29: Delokalisation und Reduktion der Expression desmosomaler Proteine.**

**(A)** Repräsentative konfokale Aufnahmen der desmosomalen Proteine Dsp, Pkp2, PG und Dsg2 an den Glanzstreifen (Pfeile) in Herzschnitten von *Dsp*<sup>+/+</sup> und *Dsp*<sup>-/-</sup>d21 Mäusen. Größenbalken: 10 $\mu$ m

**(B)** Proteinexpression der desmosomalen Proteine Dsp, Pkp2, Pg, Dsg2 und Dsc2 im Vergleich zur Ladekontrolle Gapdh in *Dsp*<sup>+/+</sup> und *Dsp*<sup>-/-</sup>d21- Mäusen.

Analysen untersucht. Auf mRNA-Ebene wurde kein Expressionsunterschied von Pkp2, Pg, Dsc2 und Dsg2 festgestellt. Dagegen wiesen  $Dsp^{-/-}$ -Herzen eine deutliche Reduktion der Proteinmenge der desmosomalen Cadherine, Dsg2 auf 15% und Dsc2 auf 12% der Expression der Kontrollgruppe, auf. Die Proteinexpression von Pkp2 (50%) und Pg (60%) verminderte sich dagegen nicht so stark (Abb.29B). In Immunfluoreszenzaufnahmen lokalisierte Pg weiterhin an den Glanzstreifen, wohingegen das Signal von Pkp2 und Dsg2 sehr stark reduziert war (Abb.29A).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden wesentlich weniger Desmosomen an den Glanzstreifen beobachtet (Abb.30). Um zu analysieren, ob sich die Desmosomen der  $Dsp$ -defizienten Kardiomyozyten von denen der Kontrollgruppe morphologisch unterscheiden, wurden jeweils 60 Desmosomen vermessen. Ein deutlicher Unterschied in der Spaltbreite ( $Dsp^{+/+}$   $16,9\pm 0,4$ nm;  $Dsp^{-/-}$   $16,2\pm 0,4$ nm;  $p>0,05$ ) und in der Desmosomenlänge ( $Dsp^{+/+}$   $179\pm 10$ nm;  $Dsp^{-/-}$   $198\pm 16$ nm;  $p>0,05$ ) wurde nicht festgestellt. Dagegen war die von einem inneren dichten Plaque zum anderen gemessene Desmosomenbreite ( $Dsp^{+/+}$   $113,6\pm 2,9$ nm;  $Dsp^{-/-}$   $78,3\pm 3,5$ nm;  $p<0,001$ ) signifikant verringert. Die Sarkomere zeigten bei gleicher Länge ( $Dsp^{+/+}$   $1635\pm 24$ nm;  $Dsp^{-/-}$   $1602\pm 21$ nm;  $p>0,05$ ) eine desorganisierte Anordnung.



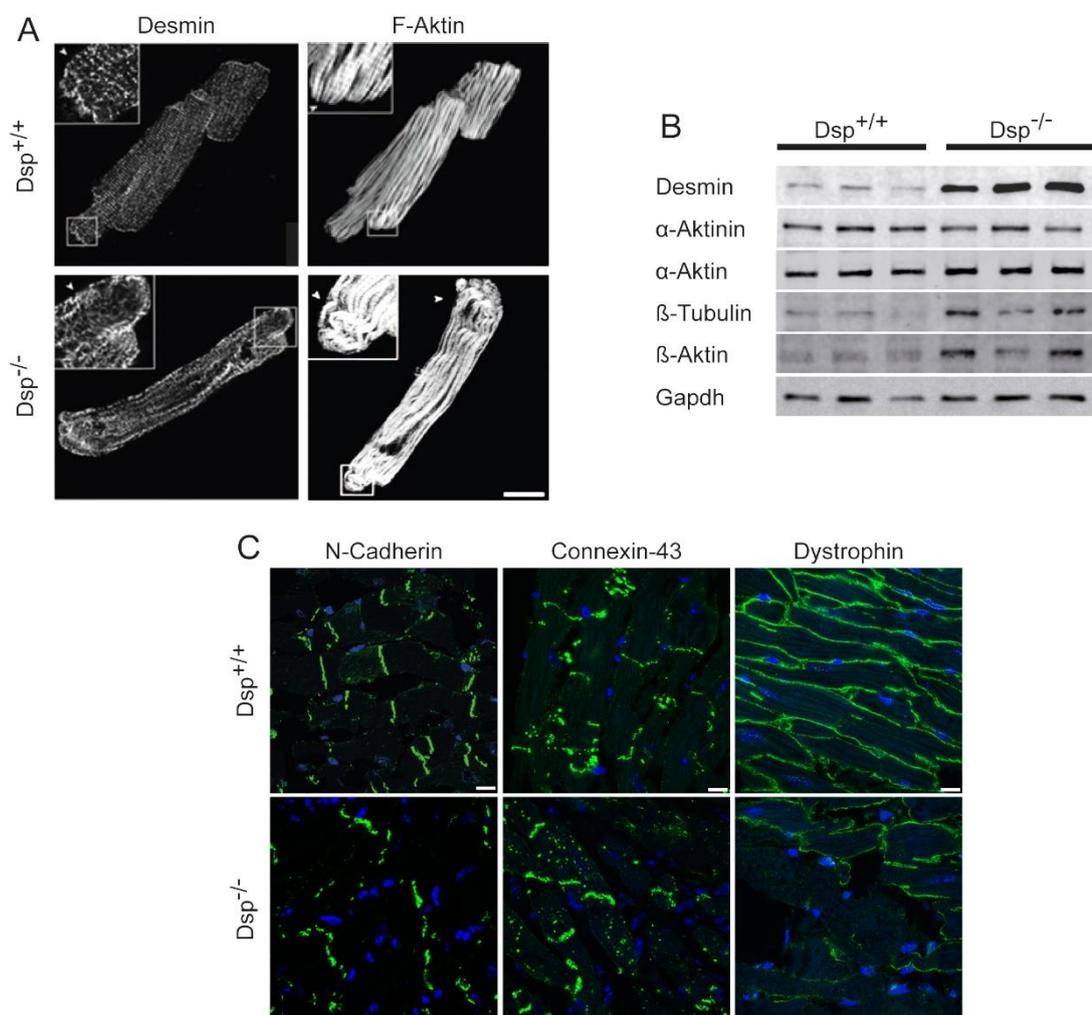
**Abbildung 30: Desmosomale Desintegration.** (A) Elektronenmikroskopie ultradünner Schnitte durch die Glanzstreifen von  $Dsp^{+/+}$ - und  $Dsp^{-/-}$ -d21- Herzen. Größenbalken: 1  $\mu$ m. (B) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von Desmosomen (Klammer: Desmosomenbreite). Größenbalken: 100nm. (C) Desmosomenbreite von je 20 Desmosomen von je drei  $Dsp^{+/+}$ - und  $Dsp^{-/-}$ -d21- Herzen. Statistik: Student's T-Test (\*\*\*)  $p<0,001$ ).

### 2.9.3. Modifikation des Zytoskeletts, Internalisierung von Gap-Junctions und Störung lateraler Zelladhäsionsstrukturen

Über die PRD-Domänen bindet Dsp das IF-System ans Desmosom. Auswirkungen der  $Dsp$ -Ablation auf das Desmin-Netzwerk und die damit assoziierten Aktinfilament- und Tubulin-Systeme wurden mit Immunfluoreszenzuntersuchungen an isolierten Kardiomyozyten analysiert. Aus  $Dsp$ -defizienten Herzen ( $n=5$ ) wurden signifikant weniger native Kardiomyozyten als aus Kontrollherzen ( $n=5$ ) isoliert ( $Dsp^{+/+}$   $42.900\pm 4.400$  Zellen/ml;  $Dsp^{-/-}$   $24.900\pm 4.900$  Zellen/ml;  $p<0,01$ ). Die immunhistologische Färbung isolierter  $Dsp$ -defizienter Kardiomyozyten zeigte ein deutlich reduziertes Desmin-Signal und

eine Desorganisation des Aktinfilamentsystems an der terminalen Membran (Abb.31A). In Western-Blot Analysen wurde in den  $Dsp^{-/-}$ d21-Mäuserherzen eine deutlich höhere Expression der nicht-sarkomeren Proteine Desmin,  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Tubulin detektiert. Die sarkomeren Proteine  $\alpha$ -Aktin und  $\alpha$ -Aktinin waren dagegen unverändert (Abb.31B).

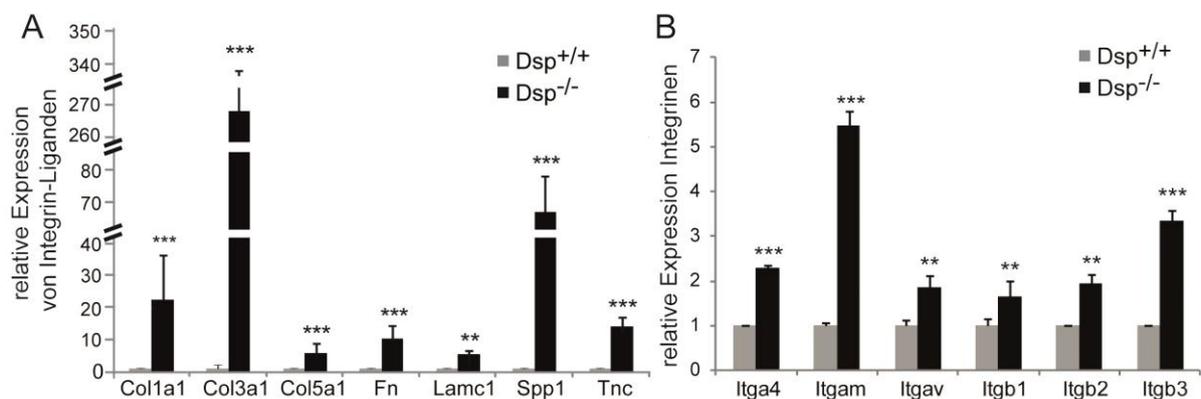
Um den Einfluss der  $Dsp$ -Deletion auf charakteristische Vertreter kardialer Adhäsionskomplexe zu untersuchen, wurden diese auf molekularer Ebene untersucht. Das Adhärenzverbindungsprotein N-Cadherin zeigte keine Veränderung. Dagegen war das Gap-Junctionprotein Cx43 teilweise internalisiert. Zudem wiesen ein großer Anteil der  $Dsp^{-/-}$ -Kardiomyozyten eine deutliche Reduktion des Dystrophin-Signals auf (Abb.31C), während andere DGC-Proteine wie Syntrophin und Dystroglycan wildtypisch lokalisiert waren. Die Protein- und mRNA-Expressionen dieser Gene unterschieden sich nicht.



**Abbildung 31: Zytoskeletale Veränderungen und nicht-desmosomale Zelladhäsionsverbindungen.**

**(A)** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Desmin und F-Aktin in isolierten Kardiomyozyten aus  $Dsp^{+/+}$ - und  $Dsp^{-/-}$ d21-Mäusen. Größenbalken: 20 $\mu$ m. **(B)** Proteinexpression der zytoskelettalen Proteine Desmin,  $\alpha$ -Aktinin,  $\alpha$ -Aktin,  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Tubulin im Vergleich zur Ladekontrolle Gapdh in  $Dsp^{+/+}$  und  $Dsp^{-/-}$ d21 Mäusen. **(C)** Repräsentative konfokale Aufnahmen von N-Cadherin, Connexin-43 und Dystrophin in gefrorenen Herzschnitten aus  $Dsp^{+/+}$  und  $Dsp^{-/-}$ d21 Mäusen. Dapi (blau). Größenbalken: 10 $\mu$ m.

Die progressive Fibrose und die Veränderung des DGC deuteten auf eine veränderte Bindung der Zelle zur Extrazellulären Matrix hin. Um dies zu überprüfen wurde die mRNA-Expression von 84 EM- und Adhäsionsmolekülen mittels eines PCR-Arrays analysiert (Tab.Anhang2). Die Gene der Familien der Cadherine (E-, N-, P- und R-Cadherin), Catenine ( $\alpha$ E,  $\alpha$ N- und  $\beta$ -Catenin), Laminine ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3) und des DGC ( $\epsilon$ -Sarcoglycan) wiesen keine deutlich veränderten Expressionen auf. Dagegen zeigten Dsp-defiziente Herzen eine signifikant erhöhte relative Expression der Integrine  $\alpha$ 4-Integrin ( $2,30 \pm 0,03$ ;  $p < 0,001$ ),  $\alpha$ M-Integrin ( $5,48 \pm 0,14$ ;  $p < 0,001$ ),  $\alpha$ V-Integrin ( $1,87 \pm 0,11$ ;  $p < 0,01$ ),  $\beta$ 1-Integrin ( $1,65 \pm 0,18$ ;  $p < 0,01$ ),  $\beta$ 2-Integrin ( $1,94 \pm 0,09$ ;  $p < 0,01$ ) sowie  $\beta$ 3-Integrin ( $3,33 \pm 0,11$ ;  $p < 0,001$ ) und deren Bindungsliganden Kollagen1a1 ( $22,36 \pm 13,28$ ;  $p < 0,001$ ), Kollagen3a1 ( $267,99 \pm 32,84$ ;  $p < 0,001$ ), Kollagen5a1 ( $5,80 \pm 1,21$ ;  $p < 0,001$ ), Fibronectin ( $10,31 \pm 1,67$ ;  $p < 0,001$ ),  $\gamma$ 1-Laminin ( $5,42 \pm 0,42$ ;  $p < 0,01$ ), Osteopontin ( $67,04 \pm 8,29$ ;  $p < 0,001$ ) und Tenascin ( $14,13 \pm 1,16$ ;  $p < 0,001$ ) (Abb.32).

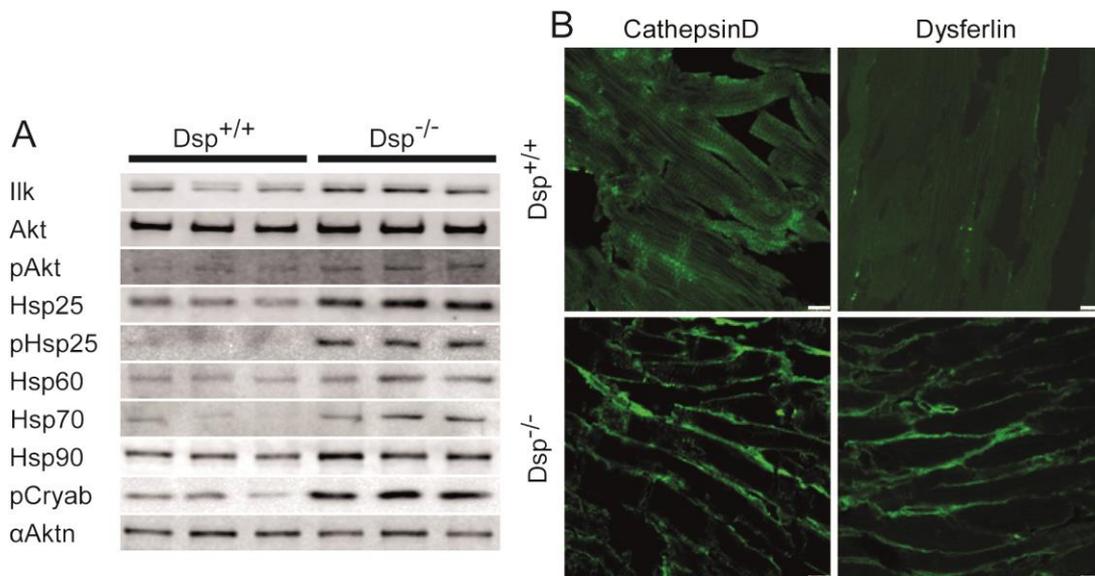


**Abbildung 32: Verstärkte Expression von Integrinen und Integrin-Liganden.** (A) Quantifizierung der relativen mRNA-Expression (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) von Kollagen1a1 (Col1a1), Kollagen3a1 (Col3a1), Kollagen5a1 (Col5a1), Fibronectin (Fn),  $\gamma$ -Laminin (Lamc1), Osteopontin (Spp1) und Tenascin (Tnc) von Dsp<sup>+/+</sup> (n=5) und Dsp<sup>-/-</sup>d21-Herzen (n=5) normalisiert mit Gapdh. (B) Quantifizierung der relativen mRNA-Expression von  $\alpha$ 4-Integrin (Itga4),  $\alpha$ M-Integrin (Itgam),  $\alpha$ V-Integrin (Itgav),  $\beta$ 1-Integrin (Itgb1),  $\beta$ 2-Integrin (Itgb2),  $\beta$ 3-Integrin (Itgb3) von Dsp<sup>+/+</sup> (n=5) und Dsp<sup>-/-</sup>d21-Herzen (n=5) normalisiert mit Gapdh. Statistik: Student's T-Test (\*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

#### 2.9.4. Aktivierung kardialer Schutzmechanismen und Verlust der Membranintegrität

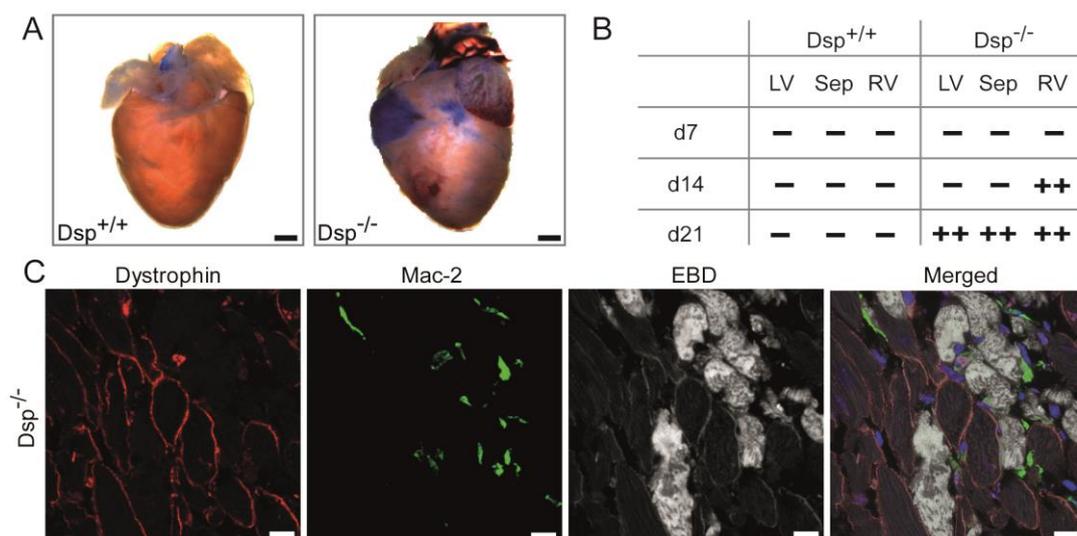
Die erhöhte Expression der Integrine und deren Liganden wies auf eine Aktivierung des Integrin-Signalwegs hin. Mithilfe von Western-Blot Analysen wurde die Expression des Integrin-Signalweegeffektors Ilk und die Phosphorylierung des Ilk-Zielgens Akt untersucht. Dsp<sup>-/-</sup>d21-Herzlysate wiesen eine deutlich erhöhte Proteinexpression von Ilk und pAkt bei unveränderter Akt-Expression auf. Diese Ergebnisse und die Erkenntnisse aus den Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäuse führten zu der Frage, ob weitere kardiale Schutzmechanismen in Dsp<sup>-/-</sup>-Herzen aktiviert sind. Western-Blot-Untersuchungen zeigten in Dsp<sup>-/-</sup>-Herzen signifikant größere Proteinmengen der protektiven Hitzeschockproteine Hsp25, pHsp25, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und pCryab (Abb.33). Zur Untersuchung des Membranreparaturmechanismus wurden Herzschnitte immunhistologisch mit Antikörpern gegen Dysferlin und CathepsinD analysiert. Die

Asperlyprotease CathepsinD ist ein Marker für Lysosomen (Steinfeld et al., 2006), die eine membranöse Quelle zur Membranreparatur sind (Han and Campbell, 2007). Beide Proteine zeigten ein deutlich verstärktes Signal an der Zellmembran von  $Dsp^{-/-}$  Kardiomyozyten (Abb.33B). Diese Ergebnisse wiesen auf eine Aktivierung des Ilk/Akt-Signalweges, der protektiven Hitzeschockproteine und der Membranreparatur in  $Dsp$ -defizienten Mausherzen hin.



**Abbildung 33: Aktivierte kardiale Schutzmechanismen. (A)** Proteinexpression von Ilk, Akt, pAkt, Hsp25, pHsp25, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und pCryab im Vergleich zur Ladekontrolle  $\alpha$ -Aktinin in  $Dsp^{+/+}$  und  $Dsp^{-/-}$  Mäusen. **(B)** Repräsentative konfokale Aufnahmen von CathepsinD und Dysferlin gefärbten gefrorenen Herzschnitten aus  $Dsp^{+/+}$  und  $Dsp^{-/-}$  Mäusen. Größenbalken: 10 $\mu$ m. Dapi (blau).

Um die Membranintegrität zu analysieren erhielten  $cDsp/MerCreMer$ -Mäuse 7, 14 und 21 Tage nach Beginn der Tamoxifengabe EBD. In Herzschnitten von  $Dsp^{-/-}$  d7-Mäusen und in den Kontroll-Herzen wurden nur wenige EBD-positive Kardiomyozyten beobachtet. Interessanterweise akkumulierte EBD

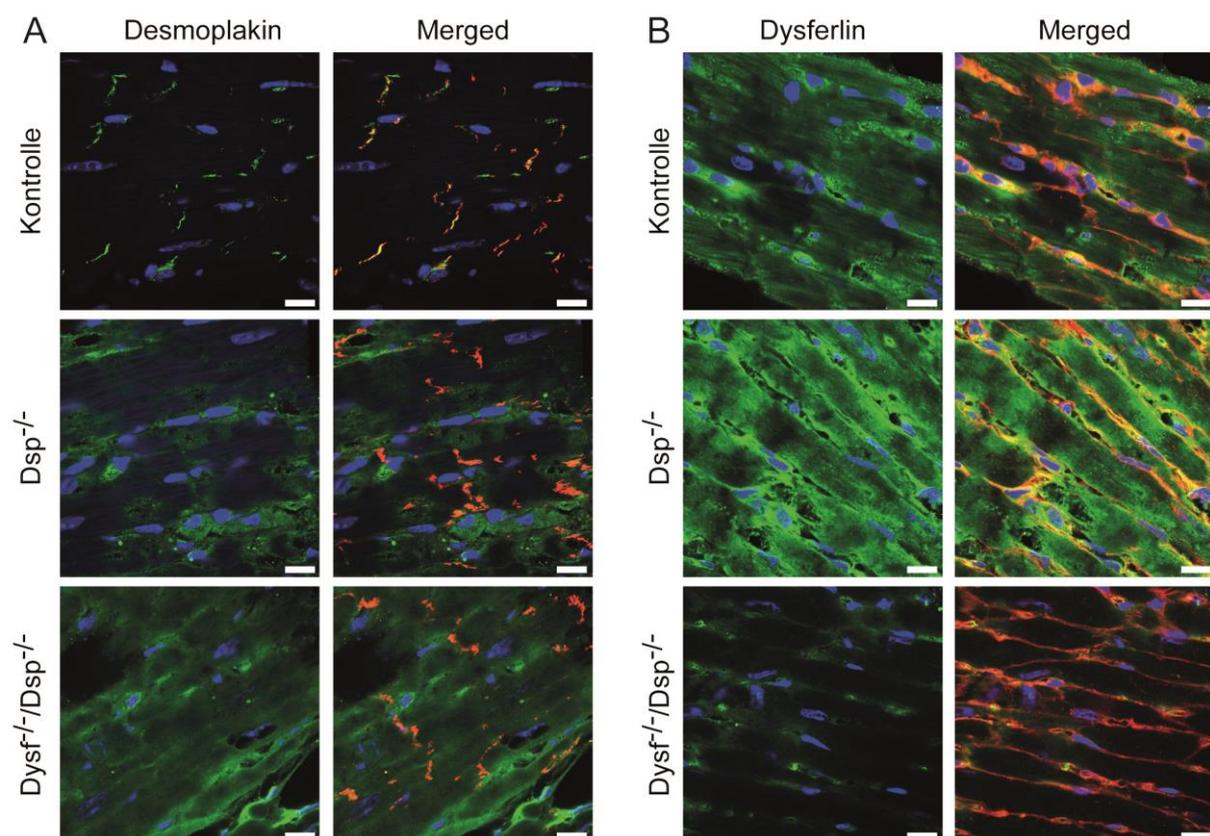


**Abbildung 34: Verlust der Membranintegrität. (A)** Repräsentative Hellfeldaufnahmen von mit EBD injizierten  $Dsp^{+/+}$ - und  $Dsp^{-/-}$  d14-Mäusen. Größenbalken: 1mm. **(B)** Anteil der EBD-positiven Kardiomyozyten zu den Zeitpunkten d7, d14 und d28 ("-" gering; "+" hoch; "++" sehr hoch) **(C)** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Dystrophin (rot), Mac-2 (grün) und EBD (weiß) gefärbten gefrorenen Herzschnitten aus  $Dsp^{+/+}$  und  $Dsp^{-/-}$  d21 Mäusen. Größenbalken: 10 $\mu$ m. Dapi (blau).

an d14 nur in den Zellen des rechten Ventrikels (Abb34A/B). Nach drei Wochen waren Kardiomyozyten sowohl im Septum, im rechten und auch im linken Ventrikel EBD-positiv. In konfokalen Aufnahmen wiesen EBD-positive Kardiomyozyten ein stark vermindertes Dystrophin-Signal auf. Zusätzlich waren diese Zellen von einer großen Anzahl Mac-2-positiver Makrophagen umgeben (Abb.34C).

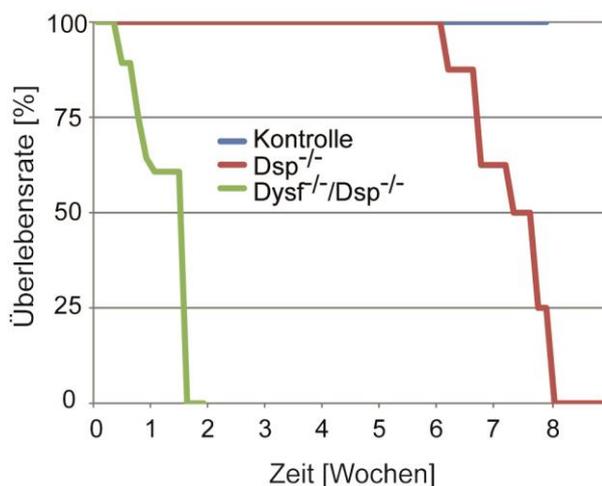
### **2.10. Der Knockout des Membranreparaturproteins Dysferlin reduziert die Lebenserwartung Desmoplakin-defizienter Mäuse**

Sowohl in den *Pkp2*<sup>-/-</sup> als auch in den *Dsp*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde eine Aktivierung des endogenen Zellmembranreparatursystems beobachtet. Eine entscheidende Funktion in diesem Mechanismus hat Dysferlin (*Dysf*), welches kalziumaktiviert die Fusion von membranösen Vesikeln mit der Zellmembran steuert. In Patienten mit mutiertem *Dysf* führt die fehlende Kompensation von Membranrupturen zur Nekrose von Muskelzellen und zum progressiven Muskelschwund (Bansal and Campbell, 2004). Bei einer Routineuntersuchung am "The Jackson Laboratory" (Bar Harbor, USA) wurde eine progressive muskuläre Dystrophie in A/J-Mäusen entdeckt. Ho et al. fanden im Intron 4 vom *Dysf*-Gen eine



**Abbildung 35: Dsp- und Dysf-Immunfluoreszenz-Analyse.** (A) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Desmoplakin (grün) und von N-Cadherin (rot; Merged) in gefrorenen Herzschnitten von Kontroll-, *Dsp*<sup>-/-</sup>d11- und *Dysf*<sup>-/-</sup>/*Dsp*<sup>-/-</sup>d11-Mäusen. Größenbalken: 10µm. Dapi (blau). (B) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Dysferlin (grün) und von wheat germ agglutinin (rot; Merged) in gefrorenen Herzschnitten von Kontroll-, *Dsp*<sup>-/-</sup>d11- und *Dysf*<sup>-/-</sup>/*Dsp*<sup>-/-</sup>d11-Mäusen. Größenbalken: 10µm. Dapi (blau).

Retrotransposon-Insertion. Dies verursacht fehlerhaftes Spleißen und die Degradation der Dysf-mRNA. Der Dystrophie-Phänotyp wird in diesen Mäusen zuerst in den proximalen Muskeln im Alter von fünf Monaten detektiert (Ho et al., 2004). Han et al. beobachteten in ein Jahr alten Dysf-Null-Mäusen die Entwicklung einer milden Kardiomyopathie, die sich durch Training verschlimmerte (Han et al., 2007). Um zu überprüfen, ob die Membranreparatur das Zugrundegehen der Kardiomyozyten und somit die Entwicklung der progressiven Herzinsuffizienz in den  $Dsp^{-/-}$ -Mäusen verzögert, wurden auf C57BL/6 zurückgekreuzte A/J-Mäuse mit den  $cDsp/MerCreMer$ -Tieren verpaart. Dazu erhielten 12 Wochen alte Dysf-negative,  $cDsp$  homozygote,  $MerCreMer$  positive Mäuse Tamoxifen-Injektionen ( $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ ), also bevor erste phänotypische Veränderungen in den  $Dysf^{-/-}$ -Mäusen auftreten (Ho 2004). Als Kontrolltiere bekamen Dysf-negative,  $cDsp$  heterozygote,  $MerCreMer$  positive Mäuse Tamoxifen (Kontrolle). Abb.35 zeigt die Expression von Desmoplakin im Vergleich zu N-Cadherin in den Versuchstiergruppen. Während in den Kontrollherzen  $Dsp$  an die Glanzstreifen lokalisierte, war die Signalintensität in  $Dsp^{-/-}$ - und  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Herzen stark reduziert. Der Vergleich mit dem Membranmarker "Wheat Germ Agglutinin" (wga) demonstriert die unterschiedliche Dysf-Expression. In Kontrollherzen ist Dysf gleichmäßig im Zytoplasma und an der Membran exprimiert. Infolge der aktivierten Membranreparatur erhöhte sich die membranöse Expression von Dysf in den  $Dsp^{-/-}$ -Kardiomyozyten. Nicht detektierbar war das Dysf-Signal in den  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Mäuserherzen.



**Abbildung 36: Kaplan-Meier-Überlebenskurve.** Anteil lebender Kontroll- (n=10),  $Dsp^{-/-}$  (n=12) und  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Mäuse (n=28) in Wochen nach Beginn der  $Dsp$ -Deletion.

Zur physiologischen Analyse wurden  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$  (n=28),  $Dsp^{-/-}$  (n=12) und Kontroll-Mäuse (n=10) an Tag 4, 7 und 11 nach Beginn der  $Dsp$ -Deletion echokardiographisch untersucht. Im Gegensatz zu den Vergleichsgruppen verstarben jedoch die ersten Doppel-Knockout-Tiere bereits nach vier Tagen. An d11 wiesen die vitalen  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Tiere eine deutliche Reduktion der Herzfunktion auf, woraufhin der Versuch beendet wurde (Abb.36).

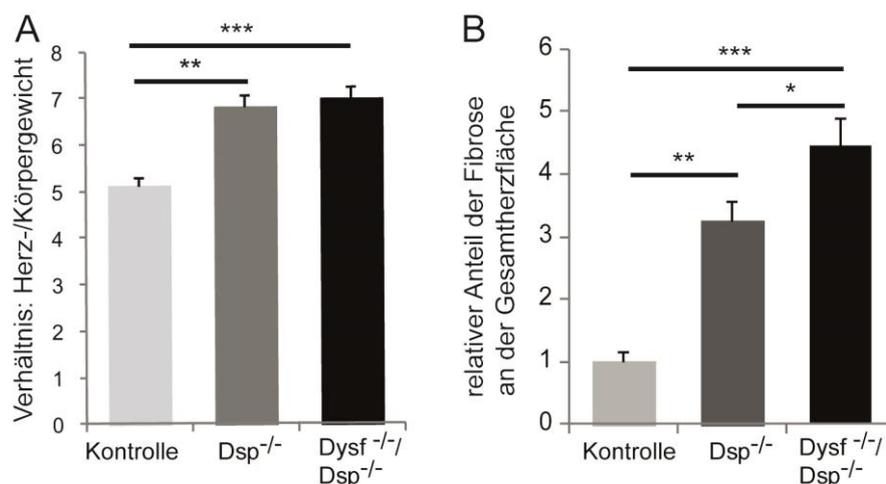
Die Herzfrequenz und die Diameter des interventrikulären Septums sowie der linksventrikulären posterioren Wand blieben unverändert. Während die  $Dsp^{-/-}$ -Mäuse

(Kontrollen:  $4,40 \pm 0,08$ mm;  $Dsp^{-/-}$ :  $5,23 \pm 0,09$ mm,  $p < 0,01$ ) einen signifikant vergrößerten linksventrikulären Durchmesser zeigten, entsprach dieser bei den Doppel-Knockout-Tieren dem der Kontroll-Mäuse ( $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ :  $4,60 \pm 0,08$ mm;  $p < 0,05$  im Vergleich zu  $Dsp^{-/-}$ ). Ejektionsfraktion (Kontrollen:  $47,33 \pm 3,48$ %;  $Dsp^{-/-}$ :  $22,75 \pm 1,49$ %;  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ :  $22,48 \pm 2,08$ %; jeweils  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle) und fraktionelle Faserverkürzung (Kontrollen:  $23,37 \pm 1,72$ %;  $Dsp^{-/-}$ :  $10,44 \pm 0,77$ %;  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ :  $10,61 \pm 1,19$ %; jeweils  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle) waren in

beiden Knockout-Tiergruppen wesentlich reduziert. Zwischen diesen existierte jedoch kein Unterschied. Im Gegensatz dazu wiesen die  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Herzen sowohl zu den Kontroll- als auch zu den  $Dsp^{-/-}$ -Herzen ein deutlich verringertes Schlag- (Kontrollen:  $31,11 \pm 1,30 \mu\text{l}$ ;  $Dsp^{-/-}$ :  $21,59 \pm 2,29 \mu\text{l}$ ,  $p < 0,01$ ;  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ :  $14,89 \pm 1,11 \mu\text{l}$ ;  $p < 0,001$  zu Kontrollen,  $p < 0,01$  zu  $Dsp^{-/-}$ ) und Herzzeitvolumen (Kontrollen:  $14,37 \pm 0,85 \text{ml/min}$ ;  $Dsp^{-/-}$ :  $10,14 \pm 1,22 \text{mm/min}$ ,  $p < 0,05$ ;  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ :  $7,69 \pm 0,54 \text{mm/min}$ ;  $p < 0,001$  zu Kontrollen,  $p < 0,05$  zu  $Dsp^{-/-}$ ) auf (Tab.Anhang3).

Zum Nachweis degradierender Kardiomyozyten wurde das Serum an d11 auf kardiales Troponin-I getestet. Dabei wurde in drei  $Dsp^{-/-}$ -Mäusen ( $n=7$ ) eine Troponin-I-Konzentration von  $0,21 \pm 0,05 \text{ng/ml}$  und in sieben Doppel-Knockout-Mäusen ( $n=11$ ) von  $0,29 \pm 0,04 \text{ng/ml}$  im Serum detektiert. In der Kontrollgruppe ( $n=6$ ) konnte in keinem Tier Troponin-I im Serum nachgewiesen werden.

Analog zu den  $Pkp2$ - bzw.  $Dsp$ -defizienten Mäusen wurde das Verhältnis des Herz-/Körpergewichts bestimmt, um eine Hypertrophie der Herzen zu detektieren. Dieser Koeffizient (Kontrollen:  $5,13 \pm 0,15$ ;  $Dsp^{-/-}$ :  $6,82 \pm 0,24$ ,  $p < 0,01$ ;  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ :  $7,01 \pm 0,25$ ;  $p < 0,001$  zu Kontrollen,  $p > 0,05$  zu  $Dsp^{-/-}$ ) lag bei beiden Knockout-Gruppen signifikant über dem der Kontrollen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ - und  $Dsp^{-/-}$ -Mäusen wurde allerdings nicht festgestellt (Abb.37A).

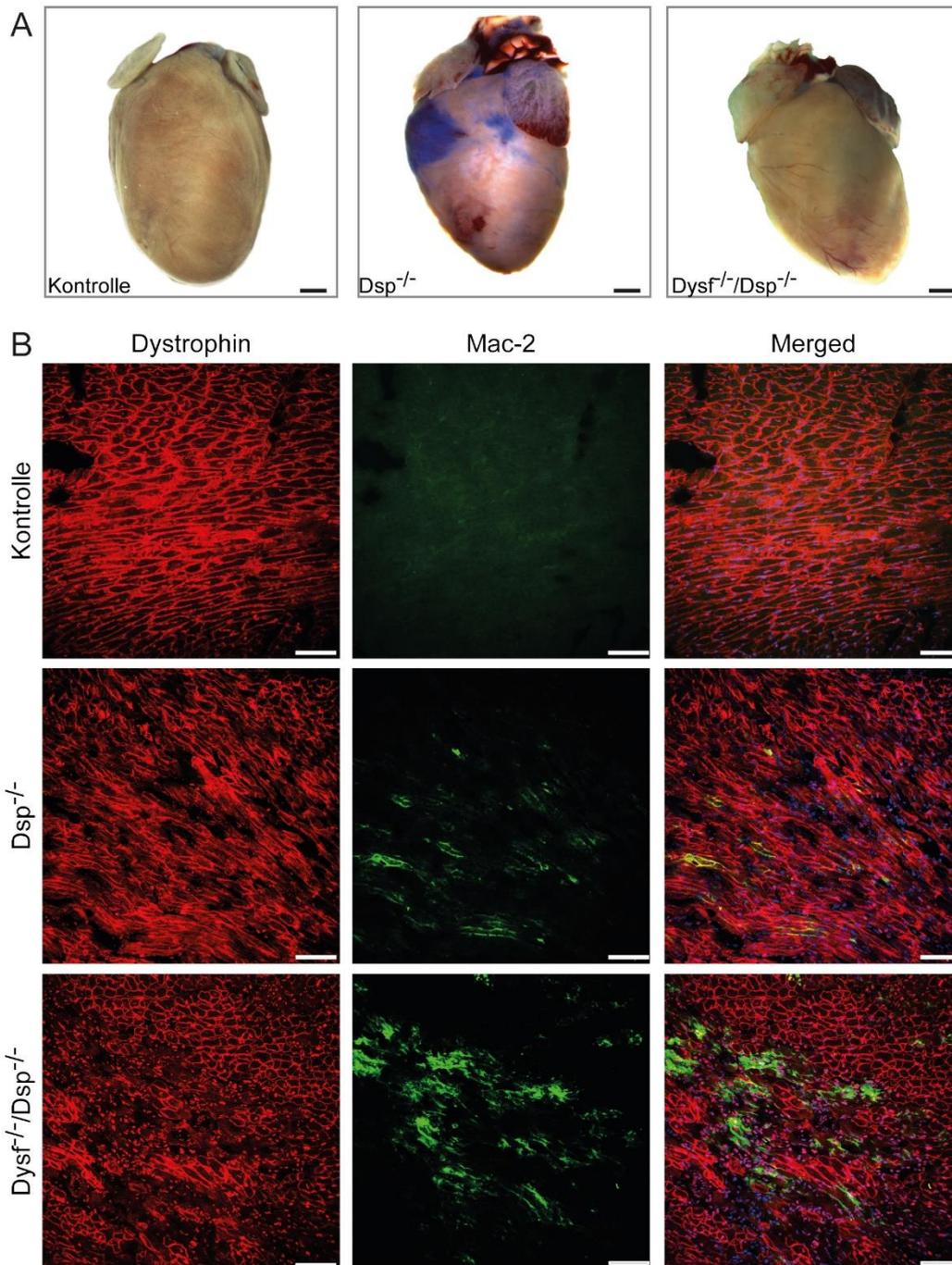


**Abbildung 37: Herz-/Körpergewicht und Fibroseanteil.** (A) Quantifizierung des Verhältnisses des Herzgewichts zum Körpergewicht von Kontroll- ( $n=5$ ),  $Dsp^{-/-}$ - ( $n=8$ ) und  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Mäusen ( $n=13$ ). (B) Relativer Fibroseanteil der Herzfläche der  $Dsp^{-/-}$ - und  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Mäusen in Bezug auf die Kontrolltiere. Statistik: Anova-Varianzanalysestest (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die Analyse der Fibrose zeigte in den Doppel-Knockout-Herzen ( $4,46 \pm 0,43$ ;  $p < 0,001$  zu Kontrollen,  $p < 0,05$  zu  $Dsp^{-/-}$ ) im Vergleich zu den  $Dsp$ -defizienten Herzen ( $3,26 \pm 0,32$ ,  $p < 0,01$  zu Kontrollen) einen deutlich erhöhten relativen Fibroseanteil (Abb.37B). Der fibrotische Anteil am Gesamtherz betrug bei den  $Dsp^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -Mäusen  $15,5 \pm 4,8\%$ .

Um zu überprüfen, ob der Verlust von Dysferlin und somit der Membranreparatur zu einem höheren Anteil Dystrophin-negativer Kardiomyozyten und einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen führt, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern gegen Dystrophin und Mac-2 durchgeführt. Wie Abb.38 verdeutlicht wurden in den Doppel-Knockout-Herzen wesentlich mehr Zellen mit einem

reduzierten Dystrophin-Signal beobachtet. Zusätzlich konnten deutlich mehr Makrophagen im Gewebe detektiert werden als  $Dsp^{-/-}$ -Herzen.



**Abbildung 38: Verlust der Membranintegrität.** (A) Repräsentative Hellfeldaufnahmen von mit EBD injizierten Kontroll-,  $Dsp^{-/-}$ -d11- und  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -d11-Mäusen. Größenbalken: 1mm. (B) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Dystrophin (rot) und Mac-2 (grün) gefärbten gefrorenen Herzschnitten aus Kontroll-,  $Dsp^{-/-}$ -d11- und  $Dysf^{-/-}/Dsp^{-/-}$ -d11-Mäusen. Größenbalken: 100 $\mu$ m. Dapi (blau). Überinandergelegte Bilder (Merged).

### 3. Diskussion

Bisherige Erkenntnisse zu Pkp2 stammen überwiegend aus *in-vitro*-Experimenten. In diesen Experimenten blieben die humoralen, hämodynamischen und mechanischen Einflüsse weitgehend unberücksichtigt. Die in dieser Arbeit generierte, konditionelle Pkp2-Knockout-Maus ermöglichte es erstmals die Funktion von Pkp2 in terminal differenzierten Kardiomyozyten in Mäusen zu untersuchen.

#### ***3.1. Kardial exprimiertes Plakophilin-2 ist essenziell für die embryonale Herzentwicklung***

Die Nullmutation von Pkp2 (Grossmann et al., 2004) führte zur embryonalen Letalität im mittleren Trächtigkeitsdrittel. Diese Studie konnte nicht zeigen, ob dies primär durch einen Defekt in den Kardiomyozyten oder durch den Pkp2-Verlust in anderen Geweben verursacht wurde. Der in dieser Arbeit verwendete herzspezifisch embryonale Knockout von Pkp2 zeigte eine Phänokopie des klassischen Pkp2-Knockout-Modells. Somit belegen die Ergebnisse eindeutig, dass es die kardiale Funktion von Pkp2 ist, die unverzichtbar für eine adäquate embryonale Herzentwicklung ist.

#### ***3.2. Plakophilin-2 und Desmoplakin sind essenziell für die adulte Herzfunktion***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die desmosomalen Proteine Pkp2 und Dsp jeweils herzspezifisch in adulten Mäusen ausgeschaltet und deren Phänotyp miteinander verglichen. Der adulte Knockout führte in beiden Mausmodellen zum Auftreten einer Letalität zwischen ein bis sechs Monaten nach Beginn der Ablation. Im Vergleich dazu überlebten 50% der von Li et al. untersuchten Pg-Knockout-Mäuse länger als 19 Monate (Li et al., 2011b). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktionen von Pkp2 und Dsp nicht durch andere Proteine kompensiert werden können. Bei Pg hingegen wird vermutlich die fehlende Funktion teilweise durch das strukturverwandte Armadillo-Protein  $\beta$ -Catenin übernommen (Choi et al., 2009).

Um die Herzfunktion der Versuchstiere zu analysieren, wurden serielle echokardiografische Untersuchungen durchgeführt. Die Knockout-Mäuse entwickelten innerhalb von drei Wochen ( $Dsp^{-/-}$ ) bzw. von acht Wochen ( $Pkp2^{-/-}$ ) eine progressive Herzinsuffizienz. Die echokardiografischen Analysen beider Knockout-Gruppen zeigten über die Zeit eine signifikante Reduktion der Herzfunktionsparameter und eine Vergrößerung der linksventrikulären Diameter. Der Anstieg der Herz/Körpergewichts-Indices und der histologisch ermittelten Kardiomyozyten-Querschnittsflächen deuten auf die Etablierung eines kompensatorischen, hypertrophen Phänotyps hin. Unterstützt wird diese Vermutung durch die signifikant erhöhte Expression der kardialen Hypertrophiemarker Anp, Bnp und  $\alpha$ -Mhc. Zudem konnte in EKG-Analysen eine signifikante Verlängerung der Erregungsausbreitung (QRS-Intervall) in den

Ventrikeln nachgewiesen werden. Ursächlich könnte die Zunahme des nicht-leitenden Bindegewebes im Myokard sein. So lag der Fibroseanteil in den Knockout-Herzen im Vergleich zu den Kontrolltieren um das Vier- bis Sechsfache höher. Der gleichzeitige Nachweis von Troponin-I im Serum der Knockout-Mäuse wies auf das Auftreten von Myokardschäden hin. Eine Zunahme von apoptotischen Kardiomyozyten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, was indirekt den Schluss nahelegt, dass in beiden Mausmodellen eine kardiomyozytäre Nekrose vorliegt. Ein weiteres indirektes Zeichen für das Vorliegen von Nekrose ist das Auftreten von Makrophagen, die nekrotische Zellreste phagozytieren. In beiden desmosomalen Knockout-Linien konnten Makrozyten-Infiltrationen im Herz detektiert werden.

Wir vermuten, dass die zugrunde gegangenen Zellen anschließend sekundär durch Bindegewebe zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion ersetzt wurden. Die herzspezifisch embryonal-deletierte Dsp-Maus (Garcia-Gras et al., 2006) zeigte zusätzlich zum fibrotischen Ersatz von Kardiomyozyten Infiltrationen von Fettgewebe. Des Weiteren wiesen die beiden transgenen Dsg2-Mausstämme (Krusche et al., 2011; Pilichou et al., 2009) Kalzifizierungen des Herzmuskels auf. In den von uns untersuchten Pkp2<sup>-/-</sup>- und Dsp<sup>-/-</sup>-Herzen konnten weder intrakardiale Fettzellen noch Kalziumpräzipitate nachgewiesen werden. Auch in anderen Mausmodellen von desmosomalen Genen konnten keine Adipozyten im Myokard detektiert werden (Garcia-Gras et al., 2006; Li et al., 2011a; Pilichou et al., 2009). Daher scheint dies kein genereller Befund bei desmosomalen Funktionsstörungen zu sein, sondern eher ein proteinspezifischer Effekt.

### ***3.3. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist in den Pkp2- und Dsp-defizienten Mäusen nicht verändert***

Garcia-Gras et al. untersuchten in embryonal herzspezifisch deletierten Dsp-Mäusen die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Sie postulierten, dass durch eine Delokalisation von Pg der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg supprimiert wird. Sie stellten die Hypothese auf, dass durch diese Hemmung eine verstärkte Adipogenese und Fibrose in den Kardiomyozyten aktiviert wird (Garcia-Gras et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigten adulte Mäuse mit kardial deletiertem Pg eine Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Die Tiere wiesen eine erhöhte mRNA-Expression der Wnt-Zielgene CyclinD1, c-jun und c-myc auf. Auf Proteinebene waren aCtnnbl und pGsk3 stärker exprimiert (Li et al., 2011b). Sowohl die Pkp2<sup>-/-</sup>- als auch die Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten keine Veränderungen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Demzufolge kann nicht von einer generellen Beteiligung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges an der Pathogenese desmosomaler Gen-Deletionen ausgegangen werden.

### **3.4. Desintegration der Desmosomen**

Die Untersuchungsergebnisse der Arbeit belegen, dass sowohl der Verlust von Pkp2 als auch von Dsp zur Desintegration der Desmosomen führt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen zeigten das vollständige Fehlen von desmosomalen Strukturen. In den Dsp<sup>-/-</sup>-Herzen war die Desmosomenzahl stark reduziert. Jedoch fehlte den vorhandenen Desmosomen der innere Plaueanteil. Dies ist der Bereich, der normalerweise durch Dsp gebildet wird. Interessanterweise konnten weiterhin regelrechte Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden. Während der Verlust von Pkp2- bzw. Dsp auf mRNA-Ebene die Expression der anderen Hauptbestandteile des Desmosoms nicht veränderte, konnte auf Protein-Ebene eine deutliche Reduktion der desmosomalen Komponenten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen desmosomalen Proteinen war die Pg-Expression in beiden Knockout-Gruppen nur leicht reduziert und weiterhin an den Glanzstreifen detektierbar. Dies könnte damit erklärt werden, dass Pg sowohl mit desmosomalen Proteinen als auch mit Molekülen der Adhärenzverbindungen interagiert (Choi et al., 2009). Das Pkp2-Signal in Dsp<sup>-/-</sup>-Mäusen bzw. das Dsp-Signal in Pkp2<sup>-/-</sup>-Mäusen war an der terminalen Membran nicht nachweisbar. In beiden Knockout-Gruppen war die Proteinexpression der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 signifikant reduziert. Dsg2 konnte weder in Pkp2- noch in Dsp-defizienten Herzschnitten an den Glanzstreifen nachgewiesen werden. Ursache dafür könnten unterschiedliche Transportmechanismen sein. Während die zytosolischen, desmosomalen Proteine Dsp, Pkp2 und Pg über das Aktinfilamentsystem zur Membran gelangen (Green et al., 2010), werden die desmosomalen Proteine Dsg2 und Dsc2 mittels Kinesinen über das mikrotubuläre Zytoskelett zur Membran transportiert (Nekrasova et al., 2011). In Zellkulturexperimenten an Epithelien konnte gezeigt werden, dass Dsp an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt ist (Lechler and Fuchs, 2007). Eine Störung des mikrotubulären Zytoskeletts könnte das Fehlen von Dsg2 an den Glanzstreifen erklären.

Während in epithelialen Geweben Adhärenzverbindungen und Desmosomen als eigenständige voneinander getrennte Strukturen vorliegen, bilden sie im Vertebratenherz den gemischten Typus der Area composita aus (Borrmann et al., 2006; Franke et al., 2006). Die Analyse des Hauptvertreters kardialer Adhärenzverbindungen N-Cadherin zeigte trotz Desintegration der Desmosomen keine Veränderungen. Somit wird N-Cadherin zum Erhalt der Zell-Zellkontakte nicht kompensatorisch überexprimiert. Interessanterweise führt der herzspezifische N-Cadherin-Knockout sowohl zur Desintegration der Adhärenzverbindungen als auch der Desmosomen (Kostetskii et al., 2005). In Bezug auf die Letalität unterscheiden sich die N-Cadherin-defizienten Mäuse jedoch nicht von den Pkp2- und Dsp-Knockout-Mäusen.

Eine Vielzahl der desmosomalen Proteine interagiert mit dem ventrikulärem Gap-Junctionprotein Cx43. Während in Pkp2<sup>-/-</sup>-Herzen Cx43 vergleichbar zu den Kontrollen exprimiert wurde, konnte eine partielle Internalisierung von Cx43 in Dsp-defizienten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Pg-defizienten Mäusen (Li et al., 2011b) mit reduziertem Cx43-Signal, war die Expression von

Cx43 an den Glanzstreifen nahezu unverändert. Auch in anderen Mausmodellen desmosomaler Gene war Cx43 unverändert an den Glanzstreifen nachweisbar (Rizzo et al., 2012; Swope et al., 2012). Ob die Internalisierung von Cx43 in *Dsp*<sup>-/-</sup>-Mäusen primär auf dessen Verlust beruht oder ob dies ein sekundärer Effekt ist, müssen weitere Studien zeigen. Eine Reduktion von Cx43 kann auch in Endstadien der hypertrophen, dilatativen und ischämischen Kardiomyopathie beobachtet werden (Nattel et al., 2007; Peters et al., 1993).

### ***3.5. Verlust der Desminbindung und Überexpression nicht-sarkomerer Zytoskelettproteine***

Die beobachtete desmosomale Desintegration der beiden Knockout-Modelle führt somit nur zu geringfügigen Veränderungen an den Glanzstreifen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine Störung der normalen, streng regelmäßigen Anordnung in Längsrichtung in den *Pkp2*- und *Dsp*-defizienten Herzen. Man nimmt an, dass an der geordneten Ausrichtung der Sarkomere das IF-Protein Desmin entscheidend beteiligt ist. Dieses umspinnt die Myofibrillen auf Höhe der Z-Scheibe, verbindet die Myofibrillen untereinander einerseits in lateraler Richtung mit dem Sarkolemm und andererseits in longitudinaler Richtung mit den Desmosomen durch die Bindung an *Dsp*. Normalerweise ist somit zum einen gewährleistet, dass die Kontraktionskraft geordnet in Längsrichtung weitergegeben wird, und zum anderen die dabei auftretenden Scherkräfte gleichmäßig lateral auf das Sarkolemm abgeleitet werden (Lazarides, 1980). Für die Aufrechterhaltung des IF-Netzwerks ist die Interaktion mit Proteinen des Mikrotubuli- und Aktinfilamentsystems von entscheidender Bedeutung (Fuchs and Cleveland, 1998). Unsere Ergebnisse belegen, dass die Desmin-Bindung und die Aktinzytoskelettstruktur im Bereich der Glanzstreifen signifikant gestört sind. Die Untersuchung der Desmin-defizienten Mäuse zeigte vergleichbare strukturelle Veränderungen der Sarkomeranordnung sowie den Verlust der Zellintegrität (Milner et al., 1996; Thornell et al., 1997). So scheint die gestörte Anbindung von Desmin ans Desmosom ähnlich schwerwiegend zu sein wie dessen Verlust. Die in den *Pkp2*- und *Dsp*-defizienten Mausherzen beobachtete Überexpression von nicht-sarkomeren Zytoskelettproteinen weist auf einen intrazellulären, strukturellen Kompensationsmechanismus hin. Veränderungen des Zytoskeletts spielen bei humanen kardialen Erkrankungen wie der Hypertrophie und der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle. Patientenstudien konnten zeigen, dass in frühen Krankheitsstadien vermehrter mechanischer Stress zunächst durch eine Akkumulation von zytoskelettalen Proteinen kompensiert werden kann. Chronischer Stress bewirkt allerdings in der späten, häufig irreversiblen Phase den Verlust von kontraktilen Filamenten (Hein et al., 2000). In der Regel folgt eine Verdichtung des Mikrotubuli-Netzwerkes, welches die Viskosität des Zytoplasmas erhöht und somit zu einer Einschränkung der Sarkomerkontraktibilität führt (Tagawa et al., 1997). Demnach könnte die echokardiografisch ermittelte, eingeschränkte Pumpfunktion der *Pkp2*- bzw. *Dsp*-Knockout-Mäuse zum einen durch die reduzierte

Ordnung der Sarkomere und zum anderen durch die Zunahme der Steifigkeit der Kardiomyozyten erklärt werden.

### **3.6. Aktivierung kardialer Schutzmechanismen**

An der lateralen Zellmembran lokalisierte Rezeptoren können Signalwege aktivieren, um einem vermehrtem Auftreten von Scherkräften entgegenzuwirken. Dabei spielen sowohl die Familie der Integrine als auch der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex eine entscheidende Rolle. Auf die im Sarkolemm verankerten Integrine wirken intrazellulär Veränderungen des Aktinzytoskeletts und extrazellulär ECM-Proteine (Berrier and Yamada, 2007; Kresh and Chopra, 2011). Integrin-vermittelt können in Kardiomyozyten verschiedene Schutzmechanismen, wie z.B. der Ilk/Akt-Signalweg, aktiviert werden. In beiden Deletions-Modellen konnte sowohl die Aktivierung des Ilk/Akt-Signalwegs als auch eine verstärkte Expression extrazellulärer Integrinliganden gezeigt werden. Somit belegen diese Resultate die Aktivierung eines zentralen Integrin-vermittelten kardialen Schutzmechanismus. Die Phosphorylierung von Akt kann verschiedene Überlebensprozesse initiieren, wie z.B. die Inhibition der Apoptose, die Aktivierung kompensatorischen Zellwachstums und die Hitzeschockprotein-vermittelte Protektion von zytoskelettalen Proteinen (Sussman et al., 2011). Dem Gegenüber kann eine chronische Aktivierung des Akt-Signalwegs auch pathologische Hypertrophien verstärken bzw. induzieren (Kemi et al., 2008).

Hitzeschockproteine (Hsp), die teilweise über den Ilk/Akt-Signalweg aktiviert werden können, spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der Zelle durch Stabilisierung von Proteinen zum Schutz vor Degradation und Beschleunigung des Abbaus nicht funktionsfähiger Proteine (Chi and Karliner, 2004). In beiden Knockout-Modellen weisen Expressionsanalysen von Hsp25, pHsp25, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und pCryab auf eine direkte Beteiligung der Hsp-vermittelten Schutzmechanismen hin. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Hsp27 und Cryab Herzen vor ischämischen Verletzungen durch Inhibition von Apoptose und Nekrose schützen kann (Martin et al., 1997; Morrison et al., 2003; Ray et al., 2001). Dabei kann aktiviertes Hsp27 im Speziellen das Aktin-Zytoskelett durch Inhibition der Polymerisation von F-Aktin schützen (Benndorf et al., 1994; Kostenko and Moens, 2009), während Cryab protektiv auf das tubuläre Zytoskelett (Bluhm et al., 1998) und den kontraktilen Apparat wirken kann (Golenhofen et al., 1998). Es ist bekannt, dass Hsp60 durch Bewahrung der im Energiestoffwechsel der Mitochondrien wichtigen Komplexe III und IV die Bereitstellung höherer intrazellulärer ATP-Spiegel gewährleistet (Lin et al., 2001).

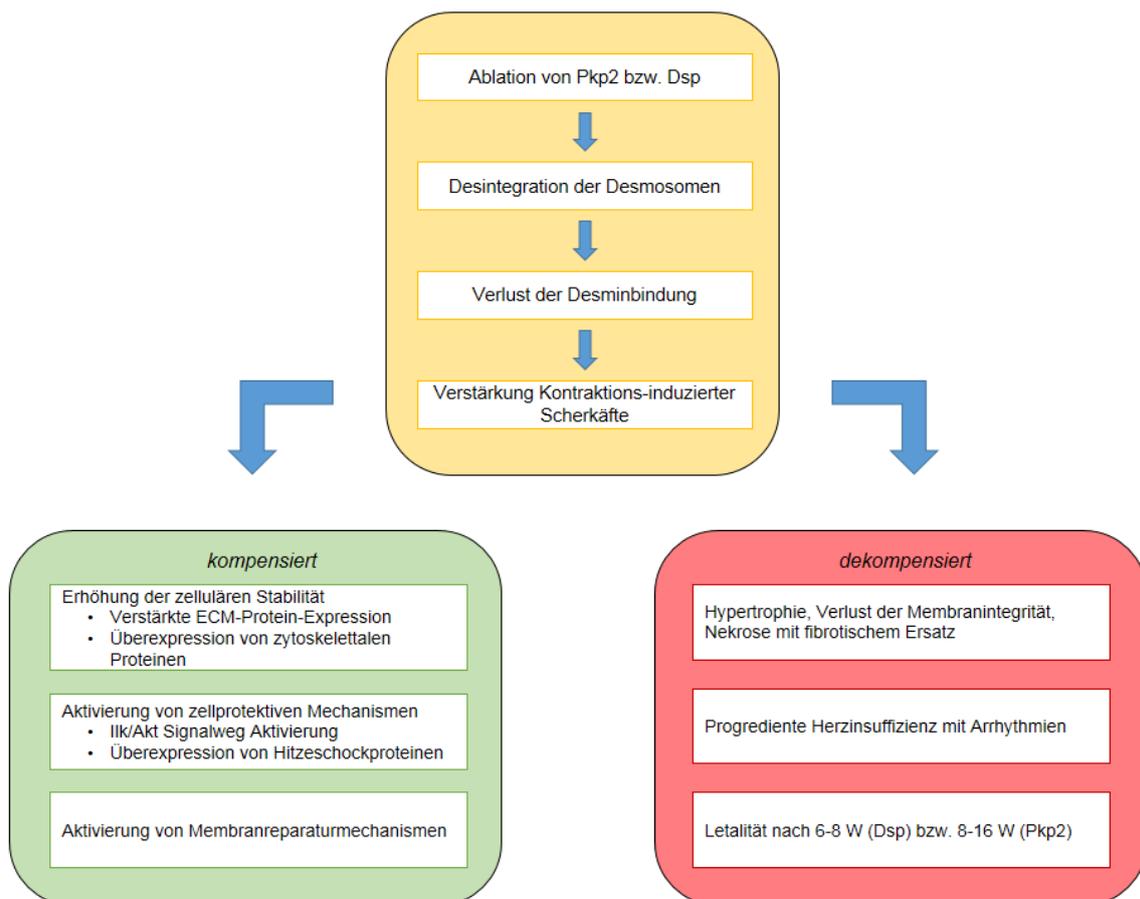
Innerhalb eines Multiproteinkomplexes kann das ATP-abhängige Hsp90 die Faltung und Aktivierung einer Vielzahl von Substratproteinen regulieren (Richter and Buchner, 2001). Guo et al. zeigten, dass sich Stress-induziert Hsp90 von dem Transkriptionsfaktor Heat Shock Faktor 1 lösen kann, infolgedessen die Expression verschiedener Hitzeschockproteine verstärkt wird (Guo et al., 2001). Eine Überexpression von Hsp90 nach pathologischem Stress wirkt auf Rattenkardiomyozyten protektiv (Bar

et al., 2002; Stephanou et al., 1998). Durch Inhibierung der inflammatorischen Mediatoren pJnk, Tnf $\alpha$  und des Nfkb-Signalwegs (Chung et al., 2008; Park et al., 2001; Senf et al., 2008) kann Hsp70 Zellen vor ischämischen (Marber et al., 1995) und oxidativen Stress (Su et al., 1998) schützen. Unsere Daten belegen erstmals, dass nach Ablation von desmosomalen Genen Hitzeschockproteine aktiviert werden. Diese wirken in verschiedenen intrazellulären Prozessen protektiv, wobei jedoch eine Aussage über den direkten Mechanismus nicht getroffen werden konnte.

### ***3.7. Aktivierung der Membranreparaturmechanismen und Verlust der Membranintegrität***

Die bei der Kontraktion der Sarkomere auftretenden Scherkräfte werden im Bereich der Costamere über den Dystrophin-Glykoprotein-Komplex gleichmäßig an die laterale Zellmembran weitergegeben (Prins et al., 2009; Stone et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass Störungen des IF-Netzwerks Auswirkungen auf die Funktion des DGC-Komplexes haben können (O'Neill et al., 2002). Die Immunfluoreszenzaufnahmen von Pkp2<sup>-/-</sup> als auch von Dsp<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten belegen eine deutliche Reduktion des zytoskelettalen Linkerproteins Dystrophin. Aus diversen Studien Dystrophin-defizienter Mäuse (mdx) ist bekannt, dass eine Störung des DGCs innerhalb der Plasmamembran die transmembrane Verbindung zwischen der ECM und des intrazellulären Zytoskeletts unterbrechen kann (Bulfield et al., 1984; Grounds et al., 2008). Der Verlust dieser Verbindung erhöht signifikant die Anfälligkeit des Sarkolemmis gegenüber Kontraktions-induzierten Verletzungen (Allen, 2001; Clarke et al., 1995; Cohn and Campbell, 2000; Petrof et al., 1993). Diese Daten suggerieren die eminente Wichtigkeit einer robusten Membranreparatur-Kapazität für die Minimierung myokardialer Zellschäden. In beiden Knockout-Modellen konnte eine starke Aktivierung des Membranreparatur-Mechanismus nachgewiesen werden. Jedoch deutete die zeitabhängige Zunahme von Membranruptur-positiven Kardiomyozyten auf eine Abnahme der Membranreparatur-Kapazität hin. Um zu überprüfen, inwieweit die Membranreparatur am Zelluntergang von Kardiomyozyten in unseren untersuchten Mäusen beteiligt ist, wurden Doppelknockout-Mäuse von Dsp und Dysf generiert und analysiert. Im Vergleich zu den Dsp<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten die Dysf<sup>-/-</sup>/Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Zunahme des myokardialen Zelluntergangs mit fibrotischem Ersatz, der in einer deutlich früheren Letalität resultierte. Die dramatische Verstärkung des pathologischen Phänotyps in Dsp<sup>-/-</sup>-Mäusen belegt die Wichtigkeit der Dysferlin-vermittelten Membranreparatur für die Aufrechterhaltung der kardiomyozytären Funktion.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Arbeit darauf hin, dass durch den Verlust wichtiger Bestandteile der Desmosomen die Bindung des IF-Proteins Desmin in Längsrichtung der Kardiomyozyten gestört ist, und so Kontraktions-induzierte Scherkräfte verstärkt auftreten. Es kommt zur Verminderung der Kontraktionskraft und zu Mikroeinrissen in der kardiomyozytären Zellmembran. Verschiedene Kompensationsmechanismen, wie z.B. der Ilk/Akt-Signalweg, die verstärkte Expression von ECM-Proteinen und zytoskelettalen Bestandteilen, die Aktivierung von protektiven Hitzeschockproteinen sowie die Aktivierung von Membranreparaturen, sind in der Lage die vitale Kardiomyozyten-Funktion über einen gewissen Zeitraum aufrechtzuerhalten. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich über die Zeit die Kapazität dieser kompensatorischen Prozesse erschöpft. Vermutlich kommt es im weiteren Verlauf zu größeren Rupturen des Sarkolemms und zum nekrotischen Zelltod mit anschließendem fibrotischem Ersatz der Kardiomyozyten. Das Überschreiten einer kritischen Anzahl zugrunde gegangener Zellen führt zu Herzinsuffizienz, Arrhythmien und eventuell zum plötzlichen Herztod (Abb.39).



**Abbildung 39: Hypothetisches Modell der Pathogenese nach Deletion von Pkp2 bzw. Dsp.**

### **3.8. Schlussfolgerung und Relevanz dieser Arbeit für die Arrhythmogene**

#### ***Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie***

Mutationen in desmosomalen Genen spielen in der Pathogenese der Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) eine wesentliche Rolle (Basso et al., 2012; Gerull et al., 2004). Je nach Studie tragen dabei 35-58% der ARVC-Patienten pathogene Mutationen im Pkp2-Gen und bis zu 23% im Dsp-Gen (Cox et al., 2011; Quarta et al., 2011). Etwa 90% der Pkp2-Mutationen resultieren in einer Trunkierung (Cox et al., 2011), so dass es vorherrschend zur Haploinsuffizienz kommt. Daher ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der Untersuchung der Deletions-Mausmodelle wichtige Hinweise auf den bisher nahezu unverstandenen Pathomechanismus geben können. Aufgrund von genetischen und physiologischen Unterschieden zwischen Maus und Mensch ist es jedoch von eminenter Bedeutung, die Ergebnisse vorher in Patientenstudien zu bestätigen. Die Evaluierung einer gestörten Bindung des IF-Systems und der dadurch verursachten Kontraktions-induzierten Schäden könnte z.B. in Herz-Biopsien von ARVC-Patienten erfolgen. Viele Studien belegen, dass intensive körperliche Belastung die Prävalenz der ARVC steigert. Da unter körperlicher Belastung die auf die Kardiomyozyten einwirkenden Scherkräfte deutlich erhöht sind, würde dies auch das Auftreten von Kontraktions-induzierten Schäden begünstigen. So ist der Anteil von ARVC-verursachten plötzlichen Herztodesfällen unter Leistungssportlern signifikant höher als in der Normalbevölkerung (Corrado et al., 1998; Corrado et al., 2000; Furlanello et al., 1998). Kontraktions-induzierte Myokardschäden würden zunächst in Regionen auftreten, die starken Scherkräften ausgesetzt sind. Laut dem Laplace-Gesetz verhält sich die Wandspannung der Herzen umgekehrt proportional zur Wanddicke. Das bedeutet, dass die Kardiomyozyten in dünnen Herzregionen höheren Scherkräften ausgesetzt sind. Die myokardialen Veränderungen bei ARVC-Patienten treten typischerweise im sogenannten „Dreieck der Dysplasie“ auf (Marcus et al., 1982). Dieser reicht von der subtrikuspidalen Region der freien rechtsventrikulären Wand zum Infundibulum bis zur Herzspitze und zeichnet sich durch einen verhältnismäßig geringen Wanddurchmesser aus.

Die an den beiden Knockout-Modellen durchgeführten Untersuchungen belegen die Beteiligung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. Dysfunktionen des DGC-Komplexes werden vor allem im Rahmen von Muskel-Dystrophien beobachtet. Dystrophin-defiziente mdx-Mäuse zeigen im höheren Alter eine signifikante Reduktion der Herzfunktionsparameter. Bei diesen Tieren werden Membranfragilität, Fibrose und Makrophageninfiltration beobachtet (Van Erp et al., 2010). In Muskel-Dystrophie-Duchenne Patienten führen Mutationen im Dystrophin-Gen zur Entwicklung von Kardiomyopathien ab dem 10. Lebensjahr (Nigro et al., 1990). Diese ist histopathologisch kaum von einer ARVC zu unterscheiden (Sen-Chowdhry et al., 2005). ARVC-typische Befunde, wie das Auftreten von invertierten T-Wellen im EKG sowie morphologische Charakteristika wie die rechtsventrikuläre Dilatation, sind bei Patienten mit Becker-Kiener Muskel-Dystrophie nachweisbar ((Melacini et al., 1996)). Bei Emery-Dreyfuss-Muskel-Dystrophie Patienten kommt es im späteren Krankheitsverlauf, wie bei der ARVC, zu einer rechtsventrikulären myokardialen Atrophie mit fibrotisch-adipösen Ersatz (Cartegni et al., 1997; Carvalho et al., 2000; Fishbein et al., 1993).

Zusammenfassend dokumentieren die Ergebnisse diese Arbeit erstmals die Bedeutung der Desmosomen für die Verringerung der Kontraktions-induzierten Scherkräfte in Kardiomyozyten. Ob die nachfolgenden Veränderungen primär oder sekundär an der Pathogenese beteiligt sind oder eine gemeinsame Endstrecke der Erkrankung darstellen, muss in zukünftigen Studien detailliert evaluiert werden. Die daraus entstehenden neuen Erkenntnisse könnten einen wertvollen Beitrag dazu leisten die Pathogenese der ARVC besser zu verstehen, neue Diagnoseverfahren und innovative Therapiestrategien zu entwickeln.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Materialien

#### 4.1.1. Materialien und Geräte

Material/Geräte	Firma
Biozero Fluoreszenzmikroskop BZ-8100	Keyence, Neu-Isenburg, BRD
Chirurgisches Besteck	FST, Bad Oeynhausen, BRD
Deckgläschen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Detection System	BioRad, Hercules, USA
DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cyclers	BioRad, Hercules, USA
Easy Perfusion System	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, BRD
Feinwaage CA770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, BRD
Fluostar Optima	BMG Labtech, Ortenberg, BRD
Geldokumentation GeldDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Gelelektrophoresekammern	Hoefer, Holliston, USA
Gellaufkammer Mini-PROTEAN 3-Cell	BioRad, Hercules, USA
Genpulser	BioRad, Hercules, USA
Glaswaren	Schott AG, Mainz, BRD
Heizblock	neoLab Migge, Heidelberg, BRD
Homogenisator Precellys 24	peqLab Biotechnology, Wilmington, USA
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL GmbH, Burgwedel, BRD
Hybridisierungsofen OV1	Biometra GmbH, Göttingen, BRD
Hybond N+,	GE Healthcare, Fairfield, USA
iCycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR	BioRad, Hercules, USA
Ismatec Pumpe ISM834	IDEX Health & Science, Wertheim, BRD
Kamera DFC 420 für DMIL Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD
Konfokales Laser Scanning Mikroskop SPE	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD
Kryo-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Kryostat Leica CM 1950	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD
Laserscanner FLA-700	Fujifilm, Tokio, Japan
Lichtmikroskop invers DMIL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD
Mikrotom Leica RM 2155	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD

Mikrospin G-25 Säulen	GE Healthcare, Fairfield, USA
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, BRD
Mini Trans-Blot Cell	BioRad, Hercules, USA
Mini-Protean 3 Elektrophorese	BioRad, Hercules, USA
Myozyten Kontraktilitäts- und Fluoreszenzsystem	IonOptix, Milton, USA
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000	peqLab Biotechnology, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, BRD
Nitrozellulose Membran Hybond ECL	GE Healthcare, Fairfield, USA
Nylon Membran	Neolab, Heidelberg, BRD
Objektträger SuperFrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, BRD
Octal Bio Amp ML 138 und PowerLab	ADInstruments GmbH, Spechbach, BRD
Odyssey® Fc	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Paraffineinbettung EC350-1	Microm, Walldorf, BRD
PCR Gefäße	BRAND GmbH, Gießen, BRD
PCR-Tube Zentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt, BRD
pH-Meter Calimatic pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, BRD
Phosphor Imager Platte	Fujifilm, Tokio, Japan
Pipette (2, 10, 20, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Plastikwaren	TPP, Berlin, BRD
PowerLab 8/30 & Octal Bio Amp	AD Instruments, Dunedin, Neuseeland
Power Pac HC	BioRad, Hercules, USA
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Saranfolie	DOW Chemical Company, Midland, USA
Skalpelle	Braun, Kronberg, BRD
Sonifikator Sonoplus 2070	Bandelin Electronics, Berlin, BRD
Sterilfilter 0,2 µm	Satorius Biotech, Aubagne, Frankreich
Sterilwerkbank Hera Safe	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Thermocycler Tetrad 2	BioRad, Hercules, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD
Thermoplatte 062	Labotec, Kapstadt, Südafrika
Thermostat Ecolite003	Lauda, Lauda-Königshofen, BRD

Tischzentrifuge Zentrifuge 5415c	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD
Trans-Blot SD Wet Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, USA
UV/VIS Photometer DU 640 Spektrophotometer	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Vevo 2100 High-Resolution	Visualsonics, Toronto, Kanada
Vevo Schallkopf Transducer MS 400	Visualsonics, Toronto, Kanada
Whatman Papier	E Healthcare, Fairfield, USA
24-Multiwell Insert System	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Zellkulturinkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, BRD

**Tabelle 4: Materialien und Geräte.**

#### 4.1.2. Chemikalien und Größenstandards

Chemikalien / Größenstandards	Firma
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, BRD
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Aluminiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
beta-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
2,3-Butadienon monoxime (BDM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Cacodylatpuffer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Collagenase Typ II; 300 U/mg	Worthington, Lakewood, USA
CTP Alpha <sup>32</sup> P	PerkinElmer, Waltham, USA
Dextransulfat-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, BRD
DMEM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
DNase I	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
50X-Denhardt's Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Direct Red 80 (Sirius Red F3B)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Eosin G	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Epon (Poly/Bed 812)	PolyScience, Illinois, USA
Erdnussöl	Fagron, Barsbüttel, BRD
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg, BRD
Eukitt® quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Evans Blue Dye (EBD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom, Berlin, BRD
Forene (Isofluran)	Abbott, Baar, Schweiz
Formamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
G418	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Ganciclovir	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Generuler 100 bp Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Glycerin	Serva, Heidelberg, BRD
Glycin	BioRad, Hercules, USA
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Hanks' Balanced Salts (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Heparin (2500 IE/5ml)	Ratiopharm, Ulm, BRD
Hepes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Heringssperma-DNA (10mg/ml)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
iCycler iQ™ Optical Tape	BioRad, Hercules, USA
iCycler iQ™ PCR Plate	BioRad, Hercules, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD

Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Isoprenaline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Komplett EDTA-freier Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD
Laminin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
LIF	Esgro, Temecula, USA
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
MEM 1018 Kultivierungsmedium	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Minimal Essential Medium Eagle 1018	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natriumbikarbonat-Lösung 7,5% (Culture Grade)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Natriumdesoxycholat	Serva, Heidelberg, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Natriumhydrogencarbonat	MERCK KGaA, Darmstadt, BRD
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
nichtessenziellen Aminosäuren	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Normales Ziegen Serum	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
NP40/Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD

Nuclear Fast Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Penicilline/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, BRD
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Pikrinsäure-Lösung (gesättigt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin, BRD
Prolong Gold Antifade Reagenz mit DAPI	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Prolong Gold Antifade Reagenz ohne DAPI	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
1,2-Propandiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Propylenoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Proteinkinase K (30 U/mg)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
RBS 35 Detergenz Konzentrat	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Restriktionsenzym AseI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Restriktionsenzym NotI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura, Northbrook, USA
Trypsin/EDTA - 0,05 % Trypsin (pH 7,2), 0,02% EDTA in PBS	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Toluol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Trichlormethan (Chloroform)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
TrisBase	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
TrisHCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD

Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
TRizol Reagenz	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Trypanblau, 0,4 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Wasserstoffperoxid, 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Xylazin 2 %	Ceva, Düsseldorf, BRD
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD

Tabelle 5: Chemikalien und Größenstandards

#### 4.1.3. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Antikörperverdünnungs-Lösung	1 % (v/v) BSA, 0,1 % (v/v) TritonX-100, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,5 % NaN <sub>3</sub> in PBS
APS-Lösung, 10 %	10 g Ammoniumpersulfat in 100 ml H <sub>2</sub> O
Block-Puffer Immunfluoreszenz	5% Normales Ziegen Serum in PBS
ECL-Komponente A	100mM TrisBase (pH: 8,8), 0,4mM p- Cumarinsäure, 2,5mM Luminol in ddH <sub>2</sub> O
ECL-Komponente B	100mM TrisBase (pH: 8,8), 0,018% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O
Denaturierungspuffer	1,5M NaCl, 0.5M NaOH
10X-DNA-Ladepuffer	0,004mM Bromphenolblau, 0,004mM Xylencyanol, 50% (v/v) Glycerin
Fixan-Lösung	4% PFA, 0.5% Glutaraldehyd in 0,1M TrisBase
Genotypisierung-Lysis-Puffer	50mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM EDTA pH: 8,0; 100mM NaCl; 0,5 % (w/v) SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K
Hybridisierungslösung	50% (v/v) Formamid, 25% (v/v) 20X-SSC-Puffer, 10% (v/v) 50X Denhardt's Lösung, 2% (v/v) 50mM EDTA, 2% Heringssperma-DNA, 1% (v/v) SDS, 5% (w/v) Dextransulfat-Natriumsalz

Kalziumfreie-Pufferlösung	10% (v/v) Kardiomyozyten-Isolierungs-Lösung A, 5% (v/v) Kardiomyozyten-Isolierungs-Lösung B, 0,5% (v/v) Kardiomyozyten-Isolierungs-Lösung C, 5,6mM Glukose, 10mM 2,3-Butadienon monoxime, 5mM Taurin; 15min mit Carbogen begast, (pH: 7,4 bei 37°C)
Kardiomyozyten-Isolierungs-Lösung A	21mM MgSO <sub>4</sub> , 1,2M NaCl, 54mM KCl
Kardiomyozyten-Isolierungs-Lösung B	400mM NaHCO <sub>3</sub>
Kardiomyozyten-Isolierungs-Lösung C	240mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Kardiomyozyten-Isolierungs-Block-Lösung	10% (w/v) BSA in Kalziumfreie-Lösung, steril filtriert
Kardiomyozyten-Isolierungs-Kalzium-Lösung	100mM CaCl <sub>2</sub> in Kalziumfreie-Lösung, steril filtriert
Kardiomyozyten-Isolierungs-Enzym-Lösung	0,08% (w/v) Collagenase Typ II; 300 U/mg in Kalziumfreie-Lösung, steril filtriert
Magermilch-Lösung, 5 %	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
Neutralisierungspuffer	1M Tris-Base (pH: 7,5), 1.5M NaCl
PBS	1,9mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 154mM NaCl in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4, autoklavieren
PBST	0,1 % (v/v) Tween in PBS
Permeabilisierungs-Lösung	0,1 % (v/v) TritonX-100 in PBS
PFA-Lösung, 4 %	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4, filtrieren
Polyacrylamid-Sammelgel	125mM TrisHCl (pH: 6,8), 4% Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 0,01% (v/v) TEMED, 0,1% (v/v) APS in ddH <sub>2</sub> O
Polyacrylamid-Trenngel	375mM TrisHCl (pH: 8,8), 7,5%/10%/12,5% Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 0,01% (v/v) TEMED, 0,1% (v/v) APS in ddH <sub>2</sub> O
Rekultivierungs-Puffer	10,7g/L MEM pH: 7,4; 2% Penicillin/Streptomycin; 2,5 % FKS
RIPA-Puffer	50mM Tris-Cl, pH 8,0; 150mM NaCl; 1 % (v/v) NP40; 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 1mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, 5mM NaF, 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1 Tablette Protease Inhibitor pro 10ml
SDS-Laufpuffer	25mM Tris-Base; 192mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer, 5x	250mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 50 % (w/v) Glycerin; 500mM DTT in H <sub>2</sub> O

20X-SSC-Puffer	175g NaCl, 88g Na-Citrat, in 1L ddH <sub>2</sub> O (pH: 7,0)
Transfer-Puffer	25mM Tris-Base; 192mM Glycin; 0,01% (w/v) SDS; 10% (v/v) Methanol in H <sub>2</sub> O
TBE-Lösung	90mM Tris-Base, 90mM Borsäure, 1mM EDTA (pH: 8,0)
TBST	50mM TrisBase, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20
TTE-Lösung	90mM Tris-Base, 30mM Taurin, 1mM EDTA

**Tabelle 6: Puffer und Lösungen.**

#### 4.1.4. Kits

Kit	Firma
Absolute SYBR Green Mix Fluorescein	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit	Millipore, Billerica, USA
DC Protein Assay nach Lowry	BioRad, Hercules, USA
Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array	Qiagen GmbH, (SABioscience), Hilden, BRD
KOD Hot Start DNA Polymerase	Millipore, Billerica, USA
Megaprim DNA Labeling System, dNTP	GE Healthcare, Fairfield, USA
Mouse Cardiac Tn-I (for serum)	Life Diagnostics, West Chester, USA
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Düren, BRD
Superscript II	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, BRD
TaqMan® Gene Expression Master-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, BRD
Taq-Polymerase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

**Tabelle 7: Kits.**

### 4.1.5. Antikörper

Antigen	Donor	Firma	Kat.Nr.	Verdünnungen	
				IF	WB
<b>Primäre Antikörper</b>					
$\alpha$ -Aktin	Kaninchen	Sigma	A2066		1:200
$\beta$ -Aktin	Kaninchen	Cell Signaling	4970		1:1000
$\alpha$ -Aktinin	Maus	Sigma	A7811		1:800
Akt (pan) (C76E7)	Kaninchen	Cell Signaling	4691		1:1000
phospho-Akt (Ser473)-XP	Kaninchen	Cell Signaling	4060		1:1000
N-Cadherin	Kaninchen	Santa Cruz	sc-7939	1:200	1:2500
Caveolin-3	Kaninchen	Abcam	ab2912	1:100	
$\alpha$ -1-Catenin	Kaninchen	Abcam	ab51032		1:50000
$\beta$ -Catenin (D10A8) XP	Kaninchen	Cell Signaling	8480		1:1000
Active- $\beta$ -Catenin	Maus	Millipore	05-665		1:5000
$\gamma$ -Catenin (Plakoglobin)	Maus	BD Bioscience	610235	1:1000	1:1000
CathepsinD	Maus	Abcam	ab6313	1:1000	
Connexin-43/GJA1	Kaninchen	Abcam	ab11370	1:300	1:5000
alphaB Crystallin	Maus	Abcam	ab13496		1:1000
alphaB-Crystallin (pSer59)	Kaninchen	Enzo	adi-spa-227		1:1000
Desmin XP	Kaninchen	Cell Signaling	5332	1:100	1:1000
Desmocollin-2	Kaninchen	Geschenk von David Garrod	(Vilela et al., 1995)		1:800
Desmoglein1+2	Maus	Progen	61002	1:10	1:20
Desmoplakin I&II	Maus	Progen	65146	1:10	1:10
Dysferlin	Maus	Leica	Ncl-Hamlet	1:20	
$\alpha$ -Dystroglycan	Maus	Millipore	05-593	1:100	1:1000
Dystrophin	Kaninchen	Abcam	ab15277	1:400	1:200
Galectin-3 (Mac-2)	Ratte	Acris	CL049P	1:200	
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)	Maus	Thermo	MA1-22670		1:50000
Gsk3	Maus	Millipore	05-412		1:1000
phospho GSK3 $\beta$ (Ser9) XP	Kaninchen	Cell Signaling	5558		1:1000
Hsp25	Kaninchen	Cell Signaling	2442		1:1000

phospho HSP 25 (Ser82)	Kaninchen	Cell Signaling	2406		1:1000
Hsp60	Kaninchen	Cell Signaling	4870		1:1000
Hsp70	Kaninchen	Enzo	Adi-Spa-812		1:500
Hsp90	Kaninchen	Cell Signaling	4877		1:1000
Ilk1	Kaninchen	Cell Signaling	3862		1:1000
Phalloidin Alexa488 (F-Aktin)	Ziege	Invitrogen	A12379		1:1000
Plakophilin-2	Maus	Progen	651101		4:10
Syntrophin	Maus	Abcam	ab11425	1:100	1:5000
wga AlexaFluor 555	/	Invitrogen	W32464	1:400	
$\alpha$ -Tubulin	Maus	Sigma	T9026		1:100000
$\beta$ -Tubulin (9F3)	Kaninchen	Cell Signaling	2128		1:1000
<b>sekundäre Antikörper</b>					
Anti-Mouse IgG AlexaFluor 488	Ziege	Invitrogen	A-11001	1:400	
Anti-Mouse IgG AlexaFluor 555	Ziege	Invitrogen	A-21422	1:400	
Anti-Rabbit IgG AlexaFluor 488	Ziege	Invitrogen	A-11008	1:400	
Anti-Rabbit IgG AlexaFluor 555	Ziege	Invitrogen	A-21428	1:400	
Anti-Rat IgG Cy2	Esel	Jackson	712-225-150	1:400	
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Ziege	Cell Signaling	7074		1:2000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Pferd	Cell Signaling	7076		1:1000
Anti-Mouse IgG F <sub>ab</sub>	Esel	Jackson	715-007-003	1:20	

**Tabelle 8: Antikörper.** Abcam, Cambridge, Großbritannien; Acris Antibodies, San Diego, USA; BD Bioscience, Franklin Lakes, USA; Cell Signaling, Danvers, USA; Enzo Life Science, Lörrach, BRD; Epitomics, Burlingame, USA; Immunfluoreszenz (IF), Invitrogen, Carlsbad, USA; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA; Katalog-Nummer (Kat.Nr.); Leica Biosystem, Nussloch, BRD; Progen, Heidelberg, BRD; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD; Millipore, Billerica, USA; Santa Cruz, Santa Cruz, USA; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA; Western-Blot (WB); Wheat Germ Agglutinin (wga).

#### 4.1.6. Primer zur Genotypisierung und zur quantitativen real-time PCR

Die Synthese der Oligonukleotide für Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und quantitative real-time PCR (qPCR) mit SybrGreen erfolgte durch die Firma Biotex, Berlin, BRD. Die gelieferten lyophilisierten Primer wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 $\mu$ M eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Für Experimente wurde eine Arbeitsverdünnung von 5 $\mu$ M verwendet. TaqMan-Primer wurden von der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA bezogen.

Primer zur Genotypisierung	Sequenz
mPkp2 cko F	ACA ACA TCC TCA GAG ACC AGG
mPkp2 cko R	TGG AGG TAA CCA ACC AAG ATT T
Neo PF	TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG
Dsp Ko FP	TTA CCG AGC CAG GGA TAC AC
Dsp Ko RP	CCA GTC TGT GGC GTT GTT ACT
Cre 439	GAA CGC ACT GAT TTC GAC CA
Cre 639	AAC CAG CGT TTT CGT TCT GC
Nkx2.5 gen F1	GCC CTG TCC CTC AGA TTT CAC ACC
Nkx2.5 Cre gen F1	GAT GAC TCT GGT CAG AGA TAC CTG
Nkx2.5 gen R1	GCG CAC TCA CTT TAA TGG GAA GAG
Dysf-F (A/J)-F	TTC CTC TCT TGT CGG TCT AG
Dysf-F (A/J)-R	CTT CAC TGG GAA GTA TGT CG
Etn-OR-F	GCC TTG ATC AGA GTA ACT GTC
Flpe F	CTA ATG TTG TGG GAA ATT GGA GC
Flpe R	CTC GAG GAT AAC TTG TTT ATT GC

Tabelle 9: Primer zur Genotypisierung

Primer zur quantitativen real-time PCR (SybrGreen)	Sequenz
m18-S FP	CGG ACA GGA TTG ACA GAT TG
m18-S RP	CAA ATC GCT CCA CCA ACT AA
mB2m FP	CAT GGC TCG CTC GGT GAC C
mB2m RP	AAT GTG AGG CGG GTG GAA CTG
mc-jun FP	CCC CTA TCG ACA TGG AGT CTC A
mc-jun RP	GAG TTT TGC GCT TTC AAG GTT T
mc-myc FP	CCG CCG CTG GGA AAC
mc-myc RP	TCC TGG CTC GCA GAT TGT AAG
mCyclinD1 FP	GGT TCC TGT TCA CAA TAC CTC ATG
mCyclinD1 RP	ACA GGA CGA TCG CCA TCA G
mDsc2 FP	ATG CAG ATG GGA GAA GCT GT
mDsc2 RP	TGC AAC AAT TTC AGC AGA GG

mDsg2 FP	GCG CGT ACT CCT CTA ACA CC
mDsg2 RP	ACC TTC TGA CTC TGC CTG GA
mDsp FP	GCC CGG AAG AGA GAG TAT GA
mDsp RP	GAT GCT GTC ATT GAG CCT GA
mGapdh FP	AGG TTG TCT CCT GCG ACT TCA
mGapdh RP	CCA GGA AAT GAG CTT GAC AAA GTT
mPg FP	CGC ATC TCT GAG GAC AAG AAC
mPg RP	TTG ATC GGG ATC ATA CTC TGG
mPkp1 FP	AGT CCA AGT CTT CCC AGT CGT
mPkp1 RP	AAG TAG CTG CTT CTG CTC GTG
mPkp2 FP	GGC TCT CCA GAA CCT CAC AG
mPkp2 RP	GGG AAA GAT TCC GTG ACA AA
mPkp3 FP	GAT CGA CTT AGA GCT GCC AGA
mPkp3 RP	AGC TGA AGC CAG TCT GCA TAG

**Tabelle 10: Primer zur quantitativen real-time PCR (SybrGreen).** Murin (m), Forward-Primer (FP), Reverse-Primer (RP), 18-S-rRNA (18S),  $\beta$ -2-Microglobulin, Jun Onkogen (c-Jun), Protoonkogen c-Myc (c-myc), CyclinD1 (CyclinD1), Desmocollin-2 (Dsc2), Desmoglein-2 (Dsg2), Desmoplakin (Dsp), Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (Gapdh), Plakoglobin (Pg), Plakophilin-1, -2, -3 (Pkp1, -2, -3).

Primer zur quantitativen real-time PCR (TaqMan), erworben	Assay-Nummer
Actb	Mm01205647_g1
Cdh2	Mm00483213_m1
Col1a1	Mm00801666_g1
Col3a1	Mm01254476_m1
Des	Mm00802455_m1
Dmd	Mm00464475_m1
Fn1	Mm01256744_m1
Gapdh	4352339E
Gja1	Mm00439105_m1
Gusb	m01197698_m1
Hprt	Mm01545399_m1
Nppa (Anp)	Mm01255747_g1

Nppb (Bnp)	Mm00435304_g1
Snta1	Mm01251334_m1
Spp1	Mm00436767_m1
Tnc	Mm00495662_m1
$\alpha$ -Mhc	Mm01313830_g1
$\beta$ -Mhc	Mm00600555_m1
Tubb4	Mm00726185_s1

**Tabelle 11: Primer zur quantitativen real-time PCR (TaqMan).**  $\beta$ -Aktin (Actb), N-Cadherin (Cdh2), Collagen1a1 (Col1a1), Collagen3a1 (Col3a1), Desmin (Des), Dystrophin (Dmd), Fibronectin-1 (Fn1), Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (Gapdh), Connexin-43 (Gja1),  $\beta$ -Glucuronidase (Gusb), Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyltransferase (Hprt), natriuretischen Peptide A (Nppa; ANP), natriuretischen Peptide B (Nppb; BNP),  $\alpha$ 1-Syntrophin (Snta1), Osteopontin (Spp1), Tenascin (Tnc), Myosin schwere Kette  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC), Myosin schwere Kette  $\beta$  ( $\beta$ -Mhc),  $\beta$ -Tubulin (Tubb4).

#### 4.1.7. Computersoftware

Computersoftware	Firma
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems GmbH, München, BRD
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München, BRD
BioRad IQ5	BioRad, Hercules, USA
Image Studio (Version 2.0)	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
LapChart Reader 7 (und Pro)	AD Instruments, Dunedin, Neuseeland
Lasergen SeqBuilder	DNASTAR, Madison, USA
Leica Application Suite 2.8.1	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD
Leica Application Suite AF	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD
MeasureIT	Olympus-SIS, Tokio, Japan
Nanodrop ND-1000 v3.3	peqLab Biotechnology, Wilmington, USA
Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
SigmaPlot 12.0	Systat Software, Chicago, USA
Typhoon FLA 7000 IR	GE Healthcare, Fairfield, USA

**Tabelle 12: Computersoftware.**

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Generierung des cPkp2-Mausstammes

#### 4.2.1.1. Das Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System ist ein Rekombinationssystem aus der Bakteriophage P1. Die Cre-Rekombinase bindet dabei an die 34bp große "loxP"-DNA-Sequenz (ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA T) und schneidet den Bereich zwischen zwei loxP-Sites unter Verbleib einer loxP-Sequenz aus der gDNA. In Mammalia existieren wildtypisch weder Cre-Rekombinasen noch loxP-Sequenzen. Genutzt wird das Cre/loxP-System zur Generierung konditioneller Knockout-Modelle. Dazu werden *in vitro* loxP-Sequenzen 5' und 3' von einem oder mehreren essenziellen Exonen des Zielgens integriert. Diese Tiere werden anschließend mit einer transgenen Cre-Rekombinase exprimierenden Maus verpaart. Der Promotor der Cre-Rekombinase bestimmt in welchem Gewebe und zu welchem Zeitpunkt das Cre-Enzym exprimiert wird und somit die Exone des Zielgens ausgeschnitten werden.

#### 4.2.1.2. Das Flp/Frt-System

Das Flp/Frt-System ist ein Rekombinationssystem aus *Saccharomyces cerevisiae*. Ähnlich dem Cre/loxP-System erkennt und schneidet die Flp-Rekombinase den DNA-Bereich zwischen zwei FRT-Sequenzen (GAA GTT CCT ATT CTC TAG AAA GTA TAG GAA CTT C) aus. In Mammalia kommen Flp-Rekombinasen und Frt-Sequenzen wildtypisch nicht vor.

#### 4.2.1.3. Recombineering-Technik

Zur Herstellung der cPkp2-Targeting-Vektors wurde die Recombineering-Technik nach Liu et. al (Liu et al., 2003) angewendet. Um rekombinationseffiziente *Escherischia coli* (*E. coli*)-Zelllinien wie DY380 zu generieren, wurden die Gene des RED-Systems (Poteete, 2001) der Enterobakteriophage Lambda stabil ins *E. coli*-Genom integriert. Diese *E. coli*-Stämme wurden uns freundlicherweise von Herrn Donald L. Court zur Verfügung gestellt. Das RED-System besteht aus den drei Genen Exo, Bet und Gam. Bei dauerhafter Expression dieser Gene sind die Bakterien nicht lebensfähig. Aus diesem Grund wurden die Red-Gene vom  $\lambda$ P<sub>L</sub>-Promotor (Yu et al., 2000) exprimiert. Aufgrund der Kontrolle des  $\lambda$ P<sub>L</sub>-Promotors durch den temperatursensitiven  $\lambda$ CI857-Repressor werden die Red-Gene bei 32°C nicht exprimiert. Die Inkubation bei 42 °C induziert die Expression dieser Gene. Gam inhibiert das RecBCD-System (Myers and Stahl, 1994) von *E. coli*, welches doppelsträngige, linearisierte DNA abbaut. Transformierte linearisierte, doppelsträngige DNA wird von der Exonuklease Exo von 5' nach 3' abgebaut. Das Protein Bet stabilisiert die entstandenen Einzelstränge. Durch die homologen, flankierenden Sequenzen wird der Einzelstrang als Okazaki-Fragment (Burgers, 1998) in die Wirts-DNA eingebaut. Das Recombineering-System nutzt die durch das RED-System vermittelte homologe

Rekombination zur Subklonierung von BAC-DNA in „high copy“ Plasmiden. Anschließend werden über das gleiche System loxP-Sequenzen und eine von FRT-Sites flankierte Neomycin-Kassette in das subklonierte Plasmid eingebracht. Dabei ist die Effizienz des Recombineerings umso höher, je länger die homologen, flankierenden Sequenzen sind. Für die Integration der loxP-Sequenzen sind homologe DNA-Bereiche von 45-55bp ausreichend. Für die Subklonierung von BAC-Fragmenten sind homologe, flankierende DNA-Bereiche mit einer Größe von 300-500bp erforderlich. Die Generierung des cPkp2-Targeting-Vektors wird ausführlich in meiner Diplomarbeit („Konstruktion eines Targeting-Vektors mittels Recombineering zur Generierung einer konditionellen Plakophilin 2 Knock-out Maus“, eingereicht 2007 an der Freien Universität Berlin) beschrieben.

#### *4.2.1.4. Transfektion der murinen, embryonalen Stammzellen und Generierung der chimären cPkp2-Mauslinie*

Die Transfektion der murinen, embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und die Generierung der chimären Mäuse erfolgte in Zusammenarbeit mit der "Transgenic Core Facility" des Max-Delbrück-Centrums Berlin. Die ES-Zellen der Linie E14.1 aus der 129/Ola-Mauslinie (Hooper et al., 1987) wurden in DMEM supplementiert mit 15% FKS, 100µg/ml Penicillin/Streptomycin, 1% nichtessenziellen Aminosäuren, 100µM beta-Mercaptoethanol und 500 U/ml LIF zusammen mit wachstumsinaktivierten embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen) bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7,5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kokultiviert. Mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelte und anschließend sedimentierte (300g, 5min) ES-Zellen wurden im Einfriermedium (DMEM, 50% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Diese Zellen (10<sup>7</sup> Zellen in 800µl PBS) wurden mittels Elektroporation (240V, 500µF) mit 20µg des linearisierten, aufgereinigten cPkp2-Targeting-Vektors transfiziert und auf vier Zellkulturschalen mit Feeder-Zellen verteilt. Nach einem Tag wurden dem Zellkulturmedium 400 µg/ml G418 und nach fünf Tagen 2µM Ganciclovir zugesetzt. Dies selektierte die ES-Zellen mit erfolgter homologer Rekombination des Targeting-Vektors aufgrund deren Neomycinresistenz. Nach sieben bis acht Tagen wurden die Zellklone mit einer Pipette in 25µl PBS abgelöst und in 96-Loch-Platten in 25µl Trypsin/EDTA-Lösung vereinzelt. Die Zugabe von 200µl ES-Zellmedium erfolgte nach 10min. Anschließend wurden die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Aus diesen Zellen wurde die gDNA mit der Methode von Ramirez-Solis (Ramirez-Solis et al., 1992) isoliert. Zwei unabhängige, mittels Southern-Blot-Analysen identifizierte, ES-Zellklone wurden für die Blastozysteninjektionen genutzt (Huelsen et al., 2000). Die chimären Blastozysten wurden in den Uterus scheinchwangerer Ammenmäuse injiziert. Chimäre Mäuse, die aus den Blastozysteninjektionen hervorgingen, wurden mit C57Bl/6J-Mäusen verpaart.

#### 4.2.2. Tierversuche und funktionelle Untersuchungen

In den Tierversuchen wurden Mäuse (*Mus musculus*) des Stammes C57Bl/6J verwendet. Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei  $24\pm 2^\circ\text{C}$  gehalten. Als Nahrung wurde eine für Nager angepasste kommerzielle Trockendiät (Rod16; LASvendi, Soest, BRD) gegeben. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Falls nicht anders angegeben, wurden Mäuse der konditionellen/transgenen Linien im Alter von 3 Monaten analysiert. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin im Rahmen des Tierversuchsantrages (TVV REG 0176/08) genehmigt.

##### 4.2.2.1. Verwendete Mausstämme

In dieser Arbeit wurde eine konditionelle Pkp2-Mauslinie (cPkp2) generiert. Die Mäuse mit integrierten loxP-Sequenzen 3' und 5' von Exon 4 unterschieden sich phänotypisch nicht von wildtypischen C57Bl/6J-Mäusen. Zur Entfernung der Neomycin-Kassette wurden die cPkp2/Neo<sup>pos</sup>-Mäuse mit Mäusen des Flp-Stammes verpaart. Die entstandenen cPkp2/Neo<sup>neg</sup>-Mäuse wurden über 5 Generationen mit C57Bl/6J-Mäusen zur Vereinheitlichung des genetischen Hintergrundes zurückgekreuzt. Anschließend wurden diese Tiere mit verschiedenen Cre-Rekombinase-exprimierenden Mäusen zur gewebe- und zeitspezifischen Exzision von Exon 4 und der daraus resultierenden Ablation von Pkp2 verpaart.

##### 4.2.2.1.1. Flp<sup>e</sup>-Mauslinie

Die Flp<sup>e</sup>-Mauslinie (B6;SJL-Tg(ACTFLPe)9205Dym/J) wurde von "The Jackson Laboratory" (Maine, USA) bezogen. Kontrolliert wird die Flp-Rekombinase in dieser Mauslinie durch den Actb-Promotor, was zu einer Flp-Expression u.a. in den Gonaden und der Keimbahn führt (Rodriguez et al., 2000). Verpaart mit cPkp2/Neo<sup>pos</sup>-Mäusen resultiert dies in die konstitutive Deletion der Neomycin-Kassette in der F<sub>2</sub>-Generation.

##### 4.2.2.1.2. Cre-Del-Mauslinie

Die Cre-Del-Mauslinie (B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J) wurde von "The Jackson Laboratory" (Maine, USA) bezogen. In diesen Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Zytomegalovirus Minimalpromotors (CMV) in allen Geweben sowie in der Keimbahn exprimiert (Schwenk et al., 1995). Dies führt ab der F<sub>2</sub>-Generation zur konstitutiven Ablation von Pkp2.

#### 4.2.2.1.3. Nkx2.5-Cre-Mauslinie

Die Nkx2.5-Cre-Mauslinie (Stanley et al., 2002) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Richard Harvey überlassen. In diesen Mäusen steht die Cre-Rekombinase unter der Expressionskontrolle des NK2 Homeobox 5 Promotors (Nkx2.5). Nkx2.5 ist einer der frühesten Marker kardial determinierter Zellen. Nkx2.5 wird im Embryo ab Embryonaltag 7,5 (E7.5) exprimiert (Moses et al., 2001).

#### 4.2.2.1.4. MerCreMer-Mauslinie

Die MerCreMer-Mauslinie (B6.FVB(129)-Tg(Myh6-cre/Esr1\*)1Jmk/J) wurde von "The Jackson Laboratory" (Maine, USA) bezogen. In diesen transgenen Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter der transkriptionellen Kontrolle des  $\alpha$ MHC (Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha) -Promotors exprimiert. Dieser wird von zwei mutierten Ligandenbindungsdomänen des Östrogenrezeptors flankiert und somit inaktiviert. Die Behandlung der Mäuse mit dem Östrogen Antagonisten Tamoxifen führt zur herzspezifischen, induzierten Expression der Cre-Rekombinase (Sohal et al., 2001) und somit zur Deletion von Pkp2 bzw. Dsp.

#### 4.2.2.1.5. cDsp-Mauslinie

Konditionelle Dsp-Mäuse (cDsp) wurden uns freundlicherweise von Fr. Dr. Elaine Fuchs überlassen. In diesen Mäusen wird Exon 2 von Dsp von loxP-Sequenzen flankiert (Vasioukhin et al., 2001). Phänotypisch unterscheiden sich die Tiere nicht von wildtypischen C57Bl/6J-Mäusen. Die cDsp-Mäuse wurden mit MerCreMer-Mäusen verpaart, um Dsp herzspezifisch, induziert zu deletieren.

#### 4.2.2.1.6. Dysf-Mauslinie

Die Dysf-Mauslinie (B6.A-Dysf<sup>prmd</sup>/GeneJ) wurde von "The Jackson Laboratory" (Maine, USA) bezogen. Eine Retrotransposon-Insertion im Intron 4 vom Dysf-Gen verursacht fehlerhaftes Spleißen und die Degradation der Dysf-mRNA. Der Dystrophie-Phänotyp wird in diesen Mäusen in den proximalen Muskeln im Alter von fünf Monaten detektiert (Ho et al., 2004). Sieben Monate alte Mäuse zeigen degenerative und regenerative Veränderungen der proximalen Muskelgruppen, was sich durch das Vorhandensein von Fett- und fibrotischem Gewebe sowie inflammatorischen Prozessen verdeutlicht (Bittner et al., 1999).

#### *4.2.2.2. Tamoxifen-Injektion*

Zur induzierten Expression der Cre-Rekombinase erhielten 3 Monate alte mit Ethanol (70%) desinfizierte Versuchstiere intraperitoneale Tamoxifen-Injektionen (20mg/kg Körpergewicht) über 2x5 Tage mit einer zweitägigen Pause. Zur Herstellung der Injektionslösung wurden 100mg Tamoxifen mit 0,6ml 100% Ethanol und 1,4ml Erdnussöl versetzt und gevortext. Dies wurde in 8ml Erdnussöl überführt und mit dem Sonifikator bei 20%iger Intensivität vorsichtig bis zum Lösen des Tamoxifens behandelt. Aliquotes wurden bei -20°C für maximal 4 Wochen gelagert. Um den Einfluss der Cre-Expression auf den Phänotyp der Mäuse zu testen, erhielten MerCreMer-Mäuse Tamoxifen-Injektionen. An d21 und d56 zeigten sich keine der an den Knockout-Mäusen beobachtete Veränderungen.

#### *4.2.2.3. Echokardiographie*

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Herrn Martin Taube und Frau Stefanie Schelenz am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt. Die Messungen und die Auswertungen erfolgten verblindet. Die Ultraschalluntersuchungen wurden mit dem Vevo 770<sup>®</sup> System (Visual Sonic) und mit einem 30MHz Schallkopf durchgeführt. Die Mäuse wurden in einer Induktionskammer mit 2,5 Vol% Isofluran narkotisiert. Die anästhesierten Mäuse wurden in Rückenlage auf einer Wärmeplatte platziert und mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert. Die Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz von 450-550 Schlägen/min und bei einer konstanten Körpertemperatur von 37°C. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske (1-2 Vol% Isofluran, 1,5 l/min Carbogen) aufrechterhalten. Der Brustkorb wurde enthaart und mit vorgewärmtem Ultraschallgel bedeckt. Mit einer Schallfrequenz von 40MHz wurde im B-Mode die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt.

#### *4.2.2.4. Elektrokardiographie*

Elektrokardiographische (EKG) Analysen wurden verblindet von Frau Stefanie Schelenz und Herrn Martin Taube am Max-Delbrück-Centrum Berlin durchgeführt. Dazu wurden Ruhe-EKGs an narkotisierten Mäusen (1-2 Vol% Isofluran, 1,5 l/min Carbogen) bei einer konstant gehaltenen Körpertemperatur von 37°C vorgenommen. Mit Nadelelektroden des PowerLab8/30 & OctalBioAmp-Systems wurden die Extremitätenableitungen aufgenommen und ausgewertet.

#### *4.2.2.5. Explantation des Herzens*

Die Versuchstiere wurden mittels Zervikaldislokation getötet. Der Thorax wurde mit einer Dissektionsschere geöffnet, die Rippenbögen entlang der lateralen Wand aufgetrennt. Das freigelegte Herz wurde am Ausflusstrakt sowie im Bereich der absteigenden Aorta abgetrennt und sofort in 4°C gekühltem PBS gewaschen. Anhaftendes Lungen- und Thymusgewebe wurde entfernt. Das Herz wurde auf Whatman Papier kurz getrocknet und das Gewicht mit der Feinwaage bestimmt. Weitere Präparationsschnitte richteten sich nach den nachfolgenden Experimenten.

#### 4.2.2.6. Blut-/ Serumgewinnung und TroponinT-Analyse

Die Mäuse wurden direkt nach der zervikalen Dislokation mithilfe einer Schere dekapitiert und das Blut in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Das Blut (ca. 300µl) wurde bei 3000rpm für 10min zentrifugiert und der Überstand (Serum) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Serum wurde mittels eines Elisa-Assays gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem Mouse-Cardiac-Tn-I-Kit auf kardiales TroponinT analysiert und mit dem Fluostar Optima ausgewertet.

#### 4.2.2.7. Evans-Blue-Dye

Evans-Blue-Dye (EBD) ist ein Azofarbstoff mit einer hohen Affinität für Serum Albumin. Albumin und daran gebundenes EBD kann die Membran von intakten Zellen nicht passieren. EBD-behandelte Herzen wurden mittels Hellfeldaufnahmen analysiert. Angeregt bei 540nm weist EBD ein Emissionspeak bei 680nm auf, wodurch EBD-Akkumulationen in Kryoschnitten mit konfokaler Lasermikroskopie untersucht werden konnten.

#### 4.2.2.8. Isolation adulter Mauskardiomyozyten

Die Isolation von adulten Mauskardiomyozyten diente zur ganzheitlichen Beurteilung der Zellstruktur und wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thierfelder von Herrn Egon Jacobus etabliert. Diese Methode basiert auf der retrograden Aortenperfusion des murinen Herzens. Zur Vermeidung von Blutakkumulationen wurden die Mäuse 15min vor der zervikalen Dislokation mit 100µl Heparin (2500IE/5ml) intraperitoneal behandelt. Anschließend wurde das Herz schnellstmöglich präpariert und die Aorta in eiskaltem PBS auf eine Metallkanüle aufgezogen. Das mit Draht fixierte Herz wurde in der 37°C warmen Perfusions-Apparatur (Easy Perfusion System) befestigt und für 10min mit der Kalzium-freien Pufferlösung perfundiert. Der Verdau erfolgt für 12min mit der Kardiomyozyten-Isolierungs-Enzym-Lösung. Danach wurde das Herz aus der Apparatur herausgenommen und der Verdau mit der Kardiomyozyten-Isolierungs-Block-Lösung gestoppt. Gleichzeitig wurde das Herz mit Pinzetten mechanisch zerkleinert, bis keine größeren Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Diese Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz filtriert und bei 35g für 4min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Reaktivierungspuffer mit 0,2mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und die Zellen für 4min bei RT sedimentiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde die Kalziumkonzentration in vier aufeinanderfolgenden Schritten stetig erhöht (0,35; 0,5; 0,75 und 1mM). Abschließend wurde die Suspension für 4 min bei 35g zentrifugiert und die Zellen in MEM 1018 Kultivierungsmedium mit dem Kontraktilitätsinhibitor BDM aufgenommen. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden 5000 native, adulte, murine Kardiomyozyten nach der Zellzählung auf Matrigel® beschichtete Deckgläschen ausgesät und im Zellkulturschrank kultiviert.

### 4.2.3. Molekularbiologische Techniken

#### 4.2.3.1. Histologische Analysen

##### 4.2.3.1.1. Erstellung von Paraffinschnitten

Für histologische Untersuchungen wurden die Herzen zur Aufrechterhaltung der Morphologie in Paraffin eingebettet. Zunächst wurden diese nach Explantation in Höhe der Papillarmuskeln mit einem Skalpell quer geschnitten und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert, um die Proteine durch eine Vernetzung ihrer Aminosäuren durch Methylenbrücken zu stabilisieren. Aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaft von Paraffin ist eine Dehydrierung der Proben nach erfolgter Fixierung notwendig. Dies erfolgt durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (jeweils für 1h in 70%, 80%, 90%, 96% und 2x99% Ethanol) mit anschließender Klärung der Gewebeproben in zwei Toluol-Bädern (jeweils für 1h). Nach der Dehydrierung wurden die Gewebeproben in ein Paraffinbad bei 60°C eingelegt. Am nächsten Tag wurde das Paraffin zweimal gewechselt und dann mit frischem, flüssigem Paraffin in einen Block gegossen. Von vollständig erkalteten Paraffinblöcken wurden serielle Schnitte von den darin befindlichen Herzen am Mikrotom angefertigt. Mehrere 6µm dicke Schnitte wurden über ein vorgeheiztes Wasserbad (48°C) auf einen Objektträger aufgebracht und bei RT getrocknet.

##### 4.2.3.1.2. Erstellung von Kryoschnitten

Für Immunfluoreszenz-Analysen von kardialen Gewebeproben wurden Kryoschnitte angefertigt. Die Gefriereinbettung konserviert neben den Antigen-Epitopen der Proteine auch deren Enzymaktivität, wohingegen morphologische Strukturen weniger gut erhalten bleiben. Nicht fixierte quer-geschnittene Herzen wurden dazu in Kryo-Einbettkassetten in Tissue Tek eingebracht, schnellstmöglich auf Trockeneis in einem Isopropanol-Bad eingefroren und bei -80°C gelagert. Mit dem Kryostat wurden 10µm dicke serielle Schnitte hergestellt, auf Objektträger überführt und an der Luft getrocknet.

##### 4.2.3.1.3. Histologische Färbungen

Für die histologischen Färbungen mit Hämatoxylin & Eosin (H&E), mit Sirius Red und mit Alizarin-Red-S wurden Paraffinschnitte verwendet. Dazu wurden diese zunächst entparaffinisiert und rehydriert. Die Schnitte wurden zunächst bei 60°C für 30min auf Objektträgern im Hybridisierungssofen angebacken. Nach deren Abkühlung wurden die Gewebeproben in Xylolbädern (3x 5min) entparaffinisiert. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Ethanol-Reihe (2x 99%, 96%, 80% und 70% Ethanol für jeweils 3min). Nach der Färbung wurden die Paraffinschnitte mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (80%, 90%, 96%, 2x99% für jeweils 1min) dehydriert, für 2x3min in Xylol geklärt und anschließend mit Eukitt® eingedeckelt. Hellfeldaufnahmen wurden mit dem Biozero-Mikroskop von Keyence angefertigt. Dazu wurden bis zu 30 überlappende Aufnahmen des Herzens mit einem 4fach-Objektiv angefertigt und mit der Gerätesoftware zu einem Bild fusioniert.

#### 4.2.3.1.3.1. *Hämatoxylin & Eosin-Färbung*

Die H&E-Färbung ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für morphologische Untersuchungen. Zu Hämalan weiter verarbeitetes Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen, insbesondere Zellkern und Ribosomen, blau an. Der synthetische Farbstoff Eosin färbt alle basischen bzw. acidophilen Strukturen, insbesondere Zellplasmaproteine, rot an. Zur H&E-Färbung wurden die entparaffinisierten und rehydrierten Paraffinschnitte für 30sec in gefiltertem Hämatoxylin getaucht und anschließend für 3min unter fließendem Wasser gewaschen. Nach einer kurzen Spülung in 1% Essigsäure in 70% Ethanol wurden die Objektträger weitere 3min unter fließendem Wasser gewaschen und danach für 8min in gefilterter, angesäuerter (2 Tropfen Essigsäure/100ml) 0,5% Eosin-Lösung gefärbt.

#### 4.2.3.1.3.2. *Sirius-Red-Färbung*

Zur quantitativen Analyse der Fibrose wurde die Sirius-Red-Färbung auf Paraffinschnitten eingesetzt. Bei dieser Färbung werden Kollagenfasern rot und Muskelfasern sowie das Zytoplasma gelb dargestellt. Entparaffinisierte und rehydrierte Paraffinschnitte wurden dazu für 8min in Hämatoxylin gefärbt und dann für 10min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 1h in Picro-Sirius-Red-Lösung (0,1% Direkt Red 80 in gesättigter Pikrinsäure-Lösung) inkubiert und 2x in 1% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach der Dehydration in 3x 99% Ethanol und der Klärung in 2xXylol wurden die Schnitte eingedeckelt. Mit Hilfe des "Color-Threshold"-Plugins für die ImageJ-Software wurde der Anteil des fibrotischen Gewebes an der Gesamtherzfläche bestimmt.

#### 4.2.3.1.3.3. *Alizarin-Red-S-Färbung*

Zur Analyse von Kalziumablagerungen wurde die Alizarin-Red-S-Färbung durchgeführt. Bei dieser Methode wird das durch starkes Licht reduzierte Kalzium durch Silbernitrat ersetzt, was als metallisch, silberne Färbung dokumentiert werden kann. Zur qualitativen Kontrolle der Färbung wurden gleichzeitig Paraffinschnitte vom Kopf von E14.5-Embryos gefärbt. Entparaffinisierte und rehydrierte Paraffinschnitte wurde für 5min unter fließendem Wasser gewaschen. Die Gewebeproben wurden anschließend in 1% Silbernitratlösung (in ddH<sub>2</sub>O) für 2h unter einer 60-Watt-Glühlampe inkubiert. Nach erneutem Spülen für 5min unter fließendem Wasser wurde das nicht reagierte Silber mit 5% Natriumthiosulfat in ddH<sub>2</sub>O entfernt. Danach wurde das Gewebe mit gefilterter Nuclear-Fast-Red-Lösung (0,1% w/v Nuclear-Fast-Red, 5% w/v Aluminiumsulfat in ddH<sub>2</sub>O), welches Zellkerne rot und das Zytoplasma pink erscheinen lässt, gegengefärbt. Im Anschluss einer Spülung unter fließendem Wasser für 5min wurden die Gewebeproben dehydriert und eingedeckelt.

#### 4.2.3.1.3.4. *Oil-Red-O-Färbung*

Zur Färbung von in Zellen gespeicherten Triglyceriden wurde die Oil-Red-O-Färbung durchgeführt. Oil-Red-O ist ein fettlöslicher, rotfärbender Azofarbstoff. Zur qualitativen Kontrolle der Färbung wurden Kryoschnitte mit enthaltenem Fettgewebe gleichzeitig gefärbt. Dazu wurden Kryoschnitte für 10min in 4% PFA-Lösung fixiert und für 1h luftgetrocknet. Die Schnitte wurden danach für 5min in 1,2-Propandiol getaucht und für 10min in 60°C warmer 0,5% Oil-Red-O-Lösung (in 1,2-Propandiol) gefärbt. Anschließend wurden die Gewebeproben für 5min in 85% 1,2-Propandiol-Lösung differenziert und 2x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Gegengefärbt wurde das Gewebe mit einer Inkubation für 30s in Hämatoxylin nach Gill II mit nachfolgendem Waschen für 3min unter fließendem Wasser. Eingedeckelt wurden die Herzen mit Prolong Gold Antifade Reagenz.

#### 4.2.3.1.4. Bestimmung der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten

Zur Bestimmung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten wurden aus jeweils fünf H&E gefärbten Herzschnitten je 100 Kardiomyozyten aus zufällig ausgewählten Bereichen mit der Image Studio Software vermessen. In die Messung wurden nur annähernd runde Kardiomyozyten aufgenommen, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit senkrecht zur Längsrichtung geschnitten wurden.

#### 4.2.3.1.5. TUNEL-Assay

Mit dem TUNEL-Assay werden die während der Apoptose auftretenden DNA-Doppelstrangbrüche detektiert. Die dabei auftretenden freien 3'OH-Enden der DNA werden mithilfe des Enzyms „Terminal deoxynucleotidyl Transferase“ markiert. Dieses Enzym fügt den 3'OH Enden eine zufällige Sequenz von NTPs an. Dabei werden spezielle Digoxigenin gekoppelte Nukleotide verwendet, die durch einen Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert werden können. Dieser Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gekoppelt, was eine Detektion in der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Der Tunel-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers des ApopTag-Kits mit Paraffinschnitten durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde das Gewebe auf einem Objektträger nach der ProteinkinaseK-Behandlung für 10min mit DNaseI inkubiert, während die anderen Gewebeproben in PBS verblieben.

#### 4.2.3.1.6. Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde in enger Zusammenarbeit mit der Core-Facility "Elektronenmikroskopie" des Max-Delbrück-Centrums Berlin angefertigt. Dazu wurden die mit zervikaler Dislokation getöteten Mäuse mit einer Fixan-Lösung über den linken Ventrikel für 10min perfundiert. Anschließend wurden kleine Gewebestücke aus dem Herz geschnitten und mit 2,5% Glutaraldehyd in 0.1M TrisBase für drei Tage nachfixiert. Nach Überführung in 0.1M Cacodylatpuffer erfolgte eine weitere Fixierung mit 1% Osmiumtetroxid in 0.1M Cacodylatpuffer für 2h bei RT.

Danach wurden die Proben in Epon eingebettet. Dazu wurde das Gewebe 2x30min mit 0,1M TrisBase gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (15min 30%, 2x30min 50%, über Nacht 70%, 30min 70%, 2x30min 90%, 2x30min 99% Ethanol bei 4°C) entwässert. Danach wurden die Herzstücke in Propylenoxid/Epon-Mischungen (2x30min Propylenoxid, 2x30min Propylenoxid/Epon 1:1, 2x30min Propylenoxid/Epon 1:2, über Nacht in Epon bei RT) inkubiert und in einer Einbettform bei 60°C für zwei bis drei Tage polymerisiert. Semidünnschnitte (1µm) wurden mit Toluidinblau gefärbt, die Ultradünnschnitte (70nm) wurden mit Bleicitrat/Uranylacetat kontrastiert. Die Übersichtsbilder zum Herz wurden an einem EM „Morgagni“ der Firma FEI, ausgestattet mit einer CCD-Kamera Morada der Fa. Olympus SIS, aufgenommen. Die Bilder der Desmosomen wurden an einem Zeiss EM 910 mithilfe einer 1K CCD-Kamera (Proscan) erstellt.

#### 4.2.3.2. DNA

##### 4.2.3.2.1. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit dem Nanodrop-Spektrometer gemäß der Anweisung des Herstellers bestimmt. Die Messung der DNA und RNA erfolgte bei 260nm. Mit dem OD-260/280-Verhältnis wurde die DNA-Qualität ermittelt. Die RNA-Qualität wurde mit den OD-Verhältnissen 260/280 und 260/230 bestimmt.

##### 4.2.3.2.2. Phenol-Chloroform-Präzipitation

Nach der Linearisierung des cPkp2-Targeting-Vektors mit dem Restriktionsenzym NotI wurde zum Ansatz 1 Volumen Phenol gegeben, gevortext und bei 2000rpm für 5min zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Trichlormethan/Isoamylalkohol (24:1 v/v), 0,1 Volumen 3M Natriumacetat (pH: 5,5) und mit 2 Volumen 100% Ethanol versetzt, gemischt und für 30min bei -80°C stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10000rpm für 10min. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70% Ethanol gelöst und für 10min bei 10000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und mit ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 4.2.3.2.3. Southern-Blot-Analyse der embryonalen Stammzellen

Zur Southern-Blot-Analyse der transfizierten ES-Zellen wurde die isolierte gDNA mit dem Restriktionsenzym AseI verdaut, mit 0,1 Volumen 10X-DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 0,5% Agarose/TBE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel 30min in Denaturierungspuffer, 30min in Neutralisierungspuffer und 30min in 20x-SSC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde ein Kapillarblot in 20x-SSC-Puffer mit einer Hybond-N+-Membran über Nacht aufgebaut. Die DNA wurde am nächsten Tag mittels UV-Licht auf die Membran fixiert und in Hybridisierungslösung bei 42°C präinkubiert. Währenddessen wurde die 3'-externe-Pkp2-Sonde (außerhalb des subklonierten DNA-Bereichs des cPkp2-Targeting-Vektors) nach Protokoll des Herstellers mit dem "Megaprim DNA Labeling Systems" und CTP- $\alpha$ -<sup>32</sup>P radioaktiv markiert. Die Sonde wurde nach Herstellerangaben mit den Mikrosphin G-25 Säulen gereinigt, zur Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 1x 15 min in Waschlösung 1 (2x SSC, 0.1% SDS), 2x 15 min mit Waschlösung 2 (0.2x SSC, 0.1% SDS) bei 65°C gewaschen. Auf die Membran wurde über Nacht eine Phosphor-Imager-Platte aufgelegt und diese mit dem Laserscanner analysiert.

#### 4.2.3.2.4. DNA-Restriktionsverdau

DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben in dem für das Restriktionsenzym geeigneten Puffer geschnitten. Der Verdau erfolgte mit 1% (v/v) Restriktionsenzym über Nacht bei 37°C.

#### 4.2.3.2.5. Herstellung der 3'-externen Pkp2-Sonde

Die 3'-externe Pkp2-Sonde wurde mittels PCR und der Kod Hotstart-Polymerase nach dem Protokoll des Herstellers mit einer Annealingtemperatur von 55°C in einem 50 $\mu$ l-Ansatz amplifiziert. Als Template diente 1ng gDNA einer C57Bl/6J-Maus. Die Primer (F-Primer: CAA TGT TCG GTT ATG GGT CT; R-Primer: TCA CCA CAA CAA GTT TCT CTT T) wurden so gewählt, dass ein 423bp großer DNA-Bereich außerhalb des in den cPkp2-Targeting-Vektors subklonierten DNA-Bereichs amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde in einem 1% Agarose/TTE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA wurde nach Protokoll des Herstellers mit dem "Nucleospin Extract II"-Kit aus dem Gel aufgereinigt.

#### 4.2.3.2.6. Isolierung genomischer DNA aus murinen Ohrbiopsien

Für die Genotypisierung von Mäusen wurden den Tieren Ohrbiopsien entnommen. Die Biopsien wurde über Nacht bei 55°C in 50 $\mu$ l Genotypisierungs-Lysis-Puffer geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der Verdau durch 10 min bei 95°C gestoppt und bei 13000rpm für 1min zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

#### 4.2.3.2.7. Genotypisierung der Mauslinien

Die Mäuse wurden mittels PCR genotypisiert. Für den PCR-Ansatz wurde folgendes Standardprotokoll verwendet: 1x PCR-Probenpuffer, 2µM F-Primer, 2µM R-Primer, 100µM dNTPs, 2µl 1:20 verdünnter gDNA aus Ohrbiopsien, 0,1µl Taq-Polymerase (Qiagen) bzw. 0,15µl Taq-Polymerase (Neb) im 25µl-Gesamtansatz aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O. Für mehrere PCR-Ansätze wurde ein Mastermix angesetzt, um Pipettierfehler zu vermeiden. Im Thermocycler wurde folgendes Standardprogramm angewandt: 1. Prä-Denaturierung: 95 °C (5min), 2. Denaturierung: 95°C (30s), 3. Primer-Anlagerung (30s), 4. Elongation: 72°C (1min), 5. 35x Wiederholung von Schritt 2-4, 6. Elongation: 72°C (10min). Die Primer-Anlagerungs-Temperatur wurde mittels Gradienten-PCR für jede Genotypisierungs-PCR bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit 2,5µl 10x-DNA-Ladepuffer versetzt und mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem GelDoc-System dokumentiert.

Genotypisierung der cPkp2-Mäuse		
Taq-Polymerase	Qiagen	
Anlagerungstemperatur	61°C	
Primer	mPkp2 cko F mPkp2 cko R Neo PF	
amplifizierte Fragmente	Wildtyp:	798bp
	cPkp2/Neo <sup>pos</sup>	1167bp
	cPkp2/Neo <sup>neg</sup>	930bp
	Cre-induziert deletiert	208bp

**Tabelle 13: Genotypisierung der cPkp2-Mäuse.**

Genotypisierung der cDsp-Mäuse		
Taq-Polymerase	Qiagen	
Anlagerungstemperatur	61°C	
Primer	Dsp Ko FP Dsp Ko RP	
amplifizierte Fragmente	Wildtyp:	669bp
	cDsp	831bp
	Cre-induziert deletiert	320bp

**Tabelle 14: Genotypisierung der cDsp-Mäuse.**

Genotypisierung der Dysf-Mäuse (WT-Fragment)		
Taq-Polymerase	Neb	
Anlagerungstemperatur	58°C	
Primer	Dysf-F (A/J)-F Dysf-F (A/J)-R	
amplifizierte Fragmente	Wildtyp:	~200bp
Genotypisierung der Dysf-Mäuse (KO-Fragment)		
Taq-Polymerase	Neb	
Anlagerungstemperatur	58°C	
Primer	Etn-OR-F Dysf-F (A/J)-R	
amplifizierte Fragmente	Knockout:	~200bp

Tabelle 15: Genotypisierung der Dysf-Mäuse.

Genotypisierung der Flpe-Mäuse		
Taq-Polymerase	Neb	
Anlagerungstemperatur	58°C	
Primer	Flpe F Flpe R	
amplifizierte Fragmente	Transgen	~600bp

Tabelle 16: Genotypisierung der Flpe-Mäuse.

Genotypisierung der MerCreMer-Mäuse		
Taq-Polymerase	Neb	
Anlagerungstemperatur	58°C	
Primer	Cre 439 Cre 639	
amplifizierte Fragmente	Transgen	200bp

Tabelle 17: Genotypisierung der MerCreMer-Mäuse.

Genotypisierung der Nkx-Cre-Mäuse		
Taq-Polymerase	Qiagen	
Anlagerungstemperatur	61°C	
Primer	Nkx2.5 gen F1 Nkx2.5 gen R1 Nkx2.5 Cre gen F1	
amplifizierte Fragmente	Wildtyp	250bp
	Transgen	500bp

**Tabelle 18: Genotypisierung der Nkx-Cre-Mäuse.**

#### 4.2.3.2.8. DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Genotypisierungen, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde die DNA in horizontalen Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde 1% (w/v) Agarose in 1xTTE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1xTTE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Unter UV-Licht wurde die elektrophoretische Auftrennung mit dem GelDoc-System dokumentiert.

#### 4.2.3.3. RNA

##### 4.2.3.3.1. Isolierung und Reinigung der totalen RNA

Die Isolierung totaler RNA-Fractionen aus 100mg Maus-Herz wurde unter RNase-freien Bedingungen mit 500µl TRIzol durchgeführt. Das modifizierte Phenol im TRIzol denaturiert sowohl Membranproteine als auch intrazelluläre Proteine und setzt Nukleinsäuren frei. Das Herzgewebe wurde nach Herstellerangaben mit dem Homogenisator Precellys 24 für 2x30s bei 5000g mit Keramikkügelchen bei 4°C geschreddert. Die anschließende Zentrifugation für 10min mit 14000rpm bei 4°C pelletierte die unlöslichen Zellbestandteile. Der Überstand wurde mit 200µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt, für 5min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert (4°C für 15min bei 14000rpm). Vom resultierenden drei-phasigem Gemisch wurde die obere Phase vorsichtig entnommen und nach Anweisung des Herstellers mit dem "RNeasy Mini"-Kit aufgereinigt. Während des Protokolls erfolgte für 15min bei RT ein DNase-Verdau. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop und eine Qualitätskontrolle von 1µl RNA mittels Gelelektrophorese. Nur qualitativ hochwertige RNA (OD-Verhältnisse 260/280 und 260/230 um die 2,0 mit deutlicher 28S- und 18S-RNA-Banden ohne DNA-Kontamination und fragmentierter RNA) wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt.

#### 4.2.3.3.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die quantitative real-time PCR wurde mit dem "Super Script II Reverse Transkriptase"-Kit durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1µg totaler RNA-Fraktion umgeschrieben. Zunächst wurde die RNA mit 2µl (40µM) Random Hexamer (Biotex), 4µl (jeweils 2,5mM) dNTPs aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O auf 17µl für 5min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 2µl 10x-Puffer und 1µl der M-MuLV-Reverse-Transkriptase hinzugegeben und für 1h bei 42°C inkubiert. Nach der Inaktivierung des Enzyms für 10min bei 90°C wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

#### 4.2.3.3.3. Quantitative real-time PCR

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurden quantitative real-time PCRs (qPCR) mit SybrGreen und TaqMan durchgeführt. Die qPCR mit SybrGreen wurde mit selbst designten Primer-Paaren durchgeführt. Deren Sequenzen wurden mit dem Primer3Plus-Programm (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) detektiert. Es wurden nur qPCR-Primer verwendet, die nur ein Produkt mit einer maximalen Größe von 150bp amplifizieren, welches über Exongrenzen (wenn es sich nicht um ein 1-Exon-Gen handelt) verläuft. Die Spezifität der Primer wurde mit dem Blastn-Programm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) überprüft. Mittels Verdünnungsreihen wurden die Primerpaare untersucht. Nur Primerpaare mit einem Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,99 und einer Effizienz zwischen 90-105% bei einer Annealingtemperatur von 58°C wurden zur Bestimmung der relativen Genexpression verwendet. SybrGreen interkaliert in neu synthetisierte PCR-Produkte und emittiert dadurch Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 521nm. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation der PCR nimmt das Fluoreszenzsignal ebenfalls exponentiell zu. Bei der TaqMan-qPCR werden zum PCR-Mix mit Reporterfluoreszenzfarbstoffen (Fluorophor) markierte Sonden gegeben, welche in dem zu amplifizierende Produkt binden. Diese Hydrolysesonden enthalten außerdem einen Akzeptor-Fluorochrom (Quencher), der die vom Reporterfluoreszenzfarbstoff emittierten Wellenlängen absorbiert. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte nach jedem Amplifikationsschritt in Echtzeit ("real-time") mittels des IQ5-Real-Time-Detection-System. Der Zeitpunkt, an dem ein Signal den Bereich des Hintergrundsignals überschreitet und in der exponentiellen Phase der Amplifikation einen definierten Schwellenwert ("Threshold") überschreitet, wird als C<sub>T</sub>-Wert (engl.: „Cycle of Threshold“) bezeichnet. Je kleiner der C<sub>T</sub>-Wert, desto mehr cDNA-Templates waren vorhanden. Normalisiert mit einem Referenzgen, dessen Expression in den Versuchstiergruppen nicht divergiert, lassen sich die C<sub>T</sub>-Werte der untersuchten Gruppe mit denen der Kontrollgruppe relativ vergleichen. Zur Bestimmung des

Referenzgenen wurden einige der am häufigsten verwendeten Referenzgene (18S, Actb, B2m, Gapdh, Gusb und Hprt) mit verschiedenen cDNA-Template-Konzentrationen der Versuchstiergruppen verglichen. Gapdh wies dabei die geringsten Varianzen auf, weswegen es in dieser Arbeit verwendet wurde. Um möglichst identische Ausgangsbedingungen zu erreichen, wurde das Herzgewebe möglichst schnell entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die in der qPCR analysierte Ausgangs-RNA aller Versuchstiere wurden gleichzeitig aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR wurden 5ng cDNA pro Ansatz verwendet. Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei werden zunächst die  $C_T$ -Werte des Zielgens durch Abzug des  $C_T$ -Wertes des Referenzgens normalisiert ( $\Delta C_T$ ). Dann wird die mittlere Differenz des Zielgens von der Kontrollgruppe und der untersuchten Gruppe gebildet ( $\Delta\Delta C_T$ ). Aus diesem Wert wird mittels der Formel ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) der relative Expressionsunterschied zur Kontrollgruppe ermittelt.

SybrGreen qPCR				
Ansatz (25µl Gesamt)			PCR-Programm	
Substanz	Volumen	Schritt	Temperatur	Dauer
Absolute SYBR Green Mix Fluorescein	12,5µl	1.	95°C	12min
F-Primer (10µM)	0,5µl	2.	95°C	10s
R-Primer (10µM)	0,5µl	3.	58°C	20s
cDNA (1,25ng/µl)	4µl	4.	75°C	30s
ddH <sub>2</sub> O	7,5µl	40xSchritt 2. bis 4.		

Tabelle 19: SybrGreen qPCR.

TaqMan qPCR				
Ansatz (20µl Gesamt)			PCR-Programm	
Substanz	Volumen	Schritt	Temperatur	Dauer
TaqMan® Gene Expression Master-Mix	10µl	1.	50°C	2min
Primer/Sonden Mix	1µl	2.	95°C	10min
cDNA (1,25ng/µl)	4µl	3.	95°C	15s
ddH <sub>2</sub> O	5µl	4.	60°C	1min
40xSchritt 3. bis 4.				

Tabelle 20: TaqMan qPCR.

#### 4.2.3.4. Protein

##### 4.2.3.4.1. Immunfluoreszenz-Analyse

Zur Analyse von Proteinlokalisationen wurden Immunfluoreszenzanalysen mit Herz-Kryoschnitten und einen Tag auf Laminin beschichteten Deckgläschen kultivierten isolierten Kardiomyozyten angefertigt. Das Gewebe wurde zunächst für 10min mit PFA fixiert und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation für 5min mit Permeabilisierungs-Lösung. Zur Blockierung wurden die Proben für 1h mit 5% Normales Ziegen Serum in PBS und für 30min mit 10% Anti-Mouse IgG F<sub>ab</sub> in PBS behandelt. Über Nacht erfolgte die Inkubation in einer Feuchtkammer mit dem in Antikörper-Lösung verdünnten primären Antikörper. Am nächsten Tag wurde das Gewebe 3x mit PBS gewaschen und für 1h mit in Antikörper-Lösung verdünnten Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden die gefärbten Proben 3x in PBS gewaschen, mit ProLong Antifade Reagenz mit DAPI eingedeckelt und mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Leica SPE ausgewertet.

##### 4.2.3.4.2. Präparation von Gesamtproteinlysate und Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Präparation von Gesamtproteinextrakt wurde 100mg kardiales Gewebe in 500µl Ripa-Puffer mittels des Homogenisators Precellys homogenisiert. Das lysierte Gewebe wurde für 15min bei 14000rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zellfragmente zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach dem Lowry-Prinzip mit dem DC-Protein Assays nach Angaben des Herstellers. Eine BSA-Verdünnungsreihe diente als Eichgerade. Die mit ddH<sub>2</sub>O fünffach verdünnten Proteinlysate wurden bei einer Extinktion von 750nm photometrisch gemessen und die Proteinmengen bestimmt.

##### 4.2.3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). In dieser Arbeit wurde die diskontinuierlichen SDS-PAGE mittels eines Zwei-Gel-Systems angewandt. Zunächst wurden die Proteine in einem 4%-Polyacrylamid-Sammelgel in einer distinkten Bande gesammelt und anschließend in einem höher prozentigen Polyacrylamid-Trenngel aufgetrennt. Die Größe des zu detektierenden Proteins bestimmte die Polyacrylamid-Konzentration im Trenngel. Verwendet wurden 7,5%, 10% und 12,5%-Trenngele. Pro Ansatz wurden je 20µg Protein in jeweils gleichen finalen Endvolumina mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer gemischt, für 5min bei 95°C denaturiert und auf Eis bis zur Verwendung gekühlt. Als Größenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder. Die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Gellaufkammer lief für 25 min bei 50V und anschließend bis zur gewünschten Auftrennung bei 80V.

#### 4.2.3.4.4. Western-Blot-Analyse

Die Analyse der nach der Größe aufgetrennten Proteine erfolgte mithilfe von Western-Blot-Analysen. Dafür wurden nach der SDS-PAGE die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“). Der Zusammenbau der Apparatur erfolgte im Transferpuffer. Das Trenngel und die gleich große Nitrozellulosemembran wurden zwischen Whatman Papier in die "Mini Trans-Blot Cell"-Apparatur eingespannt. Der Transfer fand für 1h bei 330mA und 4°C statt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran kurz in TBST gespült. Zur Vermeidung einer unspezifische Bindung der primären Antikörper wurde 1h lang mit einer 5%igen Magermilch-Lösung blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primärer Antikörpern (5% Magermilch-Lösung) schüttelnd inkubiert. Nach dem Waschen (3x 5min in TBST) wurde die Membran mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 1h bei RT schüttelnd inkubiert und danach erneut 3x mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz in dem die Membran für 1min in einem 1:1-Gemisch der ECL-Komponente A und B gelegt wurde und anschließend mit dem Odyssey® Fc analysiert wurde.

#### 4.2.4. Statistik

Die Analyse der statistischen Signifikanz des Unterschieds der Mittelwerte zweier Gruppen wurde mit dem zweiseitigen Student-T-Test mit unbestimmter Varianz überprüft. Für Untersuchungen der statistischen Signifikanz des Unterschieds der Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen wurde der einseitige Anova-Varianzanalyse-Test vorgenommen. Durchgeführt wurden diese Tests mit der SigmaPlot-Software (Systat Software). Dieses Programm testet bei beiden Analysen die Normalverteilung (nach Shapiro-Wilk) und die Gleichheit der Varianz der Stichproben (Equal Variance Test). Das Bestehen beider Tests war die Voraussetzung zur Durchführung des Student-T- bzw. des Anova-Varianzanalyse-Tests. Die Kennzeichnung der statistischen Signifikanz innerhalb von Abbildungen erfolgte für alle Darstellungen gleich: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5. Zusammenfassung

In Kardiomyozyten bilden Desmosomen zusammen mit den Adhärenzverbindungen den gemischten Typus der Area composita. Die Ausbildung der Area composita der kardialen Glanzstreifen ist ein spät postnataler Prozess. Plakophilin-2 (PKP2) und Desmoplakin (DSP) sind essenzielle Komponenten der Desmosomen, die das Intermediärfilamentsystem mit den desmosomalen Cadherinen verbinden. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Verlust von PKP2 bzw. DSP zur Dysfunktion der Desmosomen und somit zu einer gestörten Übertragung der Kontraktionskraft führt. Zur Überwindung der embryonalen Letalität der klassischen Knockout-Mausmodelle und zur Analyse der gewebe- und zeitspezifischen Funktion generierten wir konditionelle Pkp2- und Dsp-Knockout-Mauslinien und studierten die Konsequenzen der herzspezifischen Deletion in der adulten Maus.

Sowohl der Knockout von Pkp2 als auch von Dsp verursacht eine progressive Herzinsuffizienz, eine gestörte elektrische Reizweiterleitung sowie den vorzeitigen Tod der Mäuse. Die untersuchten Herzen zeigen histopathologisch Zeichen einer Fibrose und Nekrose. Vorwiegend ist der rechte Ventrikel betroffen. Die Ablationen von Pkp2 und Dsp führen zur deutlichen Reduktion und Delokalisation desmosomaler Komponenten, im Besonderen von den desmosomalen Cadherinen. Während auf ultrastruktureller Ebene die Desmosomenzahl signifikant vermindert war, zeigte sich die Expression des Adhärenzverbindungsproteins N-Cadherin unverändert. Immunfluoreszenz-Analysen wiesen auf eine gestörte Bindung des Intermediärfilament-Proteins Desmin hin. Des Weiteren zeigen sich Hinweise auf eine Umgestaltung sowohl des mikrotubulären als auch des Aktin-Zytoskeletts. Indirekte Anzeichen wie die Reduktion des lateralen Adhäsionsverbindungsproteins Dystrophin und die Aktivierung kardialer Schutzmechanismen deuten auf eine gestörte Übertragung der Kontraktionskraft hin.

Diese Studie offenbart erstmals die essenziellen, kardialen Funktionen von Pkp2 und Dsp in der adulten Maus. Der Verlust wichtiger Bestandteile der Desmosomen beeinflusst die Funktion des Intermediärfilament-Netzwerks in Längsrichtung. Vermutlich treten so vermehrt Kontraktionsinduzierte Scherkräfte auf. Kompensationsmechanismen, wie der Ilk/Akt-Signalweg, die verstärkte Expression von ECM-Proteinen und zytoskelettalen Bestandteilen, die Aktivierung von protektiven Hitzeschockproteinen sowie die Aktivierung von Membranreparaturen, sind in der Lage die vitale Kardiomyozyten-Funktion über einen gewissen Zeitraum aufrechtzuerhalten. Wahrscheinlich ist die Kapazität dieser kompensatorischen Prozesse nach einer gewissen Zeit erschöpft, so dass es im weiteren Verlauf zu größeren Rupturen des Sarkolemms und zum nekrotischen Zelltod mit anschließendem fibrotischem Ersatz der Kardiomyozyten. Das Überschreiten einer kritischen Anzahl zugrunde gegangener Zellen führt zu Herzinsuffizienz, Arrhythmien und eventuell zum plötzlichen Herztod.

## 6. Summary

Desmosomes are colocalized with adhering junctions in the intercalated disc of cardiomyocytes, known as area composita. The formation of mature desmosomes with extended area composita structures in the heart is a late, primarily postnatal process. Plakophilin-2 (PKP2) and Desmoplakin (DSP) are obligate components of functional desmosomes connecting the desmosomal cadherin-complex to the cytoskeletal intermediate filament system. We hypothesize that loss of Pkp2 or Dsp results in impaired desmosome function which is followed by disturbed mechanotransduction. Embryonic mouse hearts null for Pkp2 or Dsp exhibit early lethality with multiple developmental abnormalities. To circumvent embryonic lethality and to investigate the biological function of these proteins in a time and tissue specific manner, we generated conditional Pkp2- and Dsp-Knockout-mice and studied the effects of their deletion in adult murine hearts.

Ablation of Pkp2 or Dsp leads to progressive heart failure, electrical conduction abnormalities and early lethality with cardiac fibrosis and necrosis, predominantly affecting the right ventricle. Loss of these proteins results in reduction and dislocation of various desmosomal components, especially of desmosomal cadherins. At ultrastructural level a significant decreased number of desmosomes can be detected, whereas expression of the adherence junction protein n-cadherin is unchanged. Disturbed anchorage of desmin is followed by remodeling of the microtubular, intermediate filament and actin cytoskeleton and attenuation of the Z-discs associated protein dystrophin. Signs of enhanced sheer stress like initiation of survival pathways, indicating a disturbed mechanotransduction and insufficient mechanical coupling.

For the first time, this study elucidates the essential, cardiac function of Pkp2 and Dsp in adult mice. In Pkp2 and accordingly in Dsp deficient animals mechanotransduction is compromised thereby increasing biomechanical stress, which can be initially compensated by the membrane repair, upregulation of heat-shock-proteins and activation of the integrin/Ilk/Akt pathway. We speculate that incremental mechanical strain is followed by exhaustion of membrane repair mechanisms and, subsequently, by loss of sarcolemmal integrity and by myocyte necrosis. Extensive loss of cardiomyocytes may lead to heart failure, arrhythmias and sudden cardiac death.

## 7. Literaturverzeichnis

- Allen, D.G. (2001). Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol Scand* *171*, 311-319.
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J.R. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* *67*, 869-877.
- Angst, B.D., Marcozzi, C., and Magee, A.I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* *114*, 629-641.
- Armstrong, D.K., McKenna, K.E., Purkis, P.E., Green, K.J., Eady, R.A., Leigh, I.M., and Hughes, A.E. (1999). Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* *8*, 143-148.
- Asimaki, A., Syrris, P., Wichter, T., Matthias, P., Saffitz, J.E., and McKenna, W.J. (2007). A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* *81*, 964-973.
- Awad, M.M., Dalal, D., Tichnell, C., James, C., Tucker, A., Abraham, T., Spevak, P.J., Calkins, H., and Judge, D.P. (2006). Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2. *Hum Mutat* *27*, 1157.
- Balda, M.S., and Matter, K. (2008). Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* *121*, 3677-3682.
- Bansal, D., and Campbell, K.P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* *14*, 206-213.
- Barnabei, M.S., Matindale, J.M., Townsend, D.W., Metzger, J.M. (2011). Exercise and Muscular Dystrophy: Implications and Analysis of Effects on Musculoskeletal and Cardiovascular Systems. *Comprehensive Physiology* *1*, 1353-1363.
- Bass-Zubek, A.E., Hobbs, R.P., Amargo, E.V., Garcia, N.J., Hsieh, S.N., Chen, X., Wahl, J.K., 3rd, Denning, M.F., and Green, K.J. (2008). Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol* *181*, 605-613.
- Basso, C., Bauce, B., Corrado, D., and Thiene, G. (2012). Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* *9*, 223-233.
- Basso, C., Corrado, D., Marcus, F.I., Nava, A., and Thiene, G. (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet* *373*, 1289-1300.
- Basso, C., Thiene, G., Corrado, D., Angelini, A., Nava, A., and Valente, M. (1996). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? *Circulation* *94*, 983-991.
- Beffagna, G., Occhi, G., Nava, A., Vitiello, L., Ditadi, A., Basso, C., Bauce, B., Carraro, G., Thiene, G., Towbin, J.A., *et al.* (2005). Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res* *65*, 366-373.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* *382*, 638-642.

- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G. (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem* 269, 20780-20784.
- Bernstein, S.A., and Morley, G.E. (2006). Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. *Adv Cardiol* 42, 71-85.
- Berrier, A.L., and Yamada, K.M. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213, 565-573.
- Bierkamp, C., McLaughlin, K.J., Schwarz, H., Huber, O., and Kemler, R. (1996). Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Dev Biol* 180, 780-785.
- Bittner, R.E., Anderson, L.V., Burkhardt, E., Bashir, R., Vafiadaki, E., Ivanova, S., Raffelsberger, T., Maerk, I., Hoger, H., Jung, M., *et al.* (1999). Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 23, 141-142.
- Bluhm, W.F., Martin, J.L., Mestril, R., and Dillmann, W.H. (1998). Specific heat shock proteins protect microtubules during simulated ischemia in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 275, H2243-2249.
- Bornslaeger, E.A., Godsel, L.M., Corcoran, C.M., Park, J.K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A.P., and Green, K.J. (2001). Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci* 114, 727-738.
- Borrmann, C.M., Grund, C., Kuhn, C., Hofmann, I., Pieperhoff, S., and Franke, W.W. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *Eur J Cell Biol* 85, 469-485.
- Brar, B.K., Railson, J., Stephanou, A., Knight, R.A., and Latchman, D.S. (2002). Urocortin increases the expression of heat shock protein 90 in rat cardiac myocytes in a MEK1/2-dependent manner. *J Endocrinol* 172, 283-293.
- Brooke, M.A., Nitoiu, D., and Kelsell, D.P. (2012). Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol* 226, 158-171.
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1189-1192.
- Burgers, P.M. (1998). Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* 107, 218-227.
- Cabral, R.M., Liu, L., Hogan, C., Dopping-Hepenstal, P.J., Winik, B.C., Asial, R.A., Dobson, R., Mein, C.A., Baselaga, P.A., Mellerio, J.E., *et al.* (2010). Homozygous mutations in the 5' region of the JUP gene result in cutaneous disease but normal heart development in children. *J Invest Dermatol* 130, 1543-1550.
- Cartegni, L., di Barletta, M.R., Barresi, R., Squarzoni, S., Sabatelli, P., Maraldi, N., Mora, M., Di Blasi, C., Cornelio, F., Merlini, L., *et al.* (1997). Heart-specific localization of emerin: new insights into Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 6, 2257-2264.
- Carvalho, A.A., Levy, J.A., Gutierrez, P.S., Marie, S.K., Sosa, E.A., and Scanavaca, M. (2000). Emery-Dreifuss muscular dystrophy: anatomical-clinical correlation (case report). *Arq Neuropsiquiatr* 58, 1123-1127.
- Cerrone, M., Noorman, M., Lin, X., Chkourko, H., Liang, F.X., van der Nagel, R., Hund, T., Birchmeier, W., Mohler, P., van Veen, T.A., *et al.* (2012). Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res* 95, 460-468.

- Chi, N.C., and Karliner, J.S. (2004). Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors. *Cardiovasc Res* 61, 437-447.
- Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikauskas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, M.B., Hwang, S.T., Rimm, D.L., and Moon, R.T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1193-1198.
- Chitaev, N.A., Leube, R.E., Troyanovsky, R.B., Eshkind, L.G., Franke, W.W., and Troyanovsky, S.M. (1996). The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *J Cell Biol* 133, 359-369.
- Choi, H.J., Gross, J.C., Pokutta, S., and Weis, W.I. (2009). Interactions of plakoglobin and beta-catenin with desmosomal cadherins: basis of selective exclusion of alpha- and beta-catenin from desmosomes. *J Biol Chem* 284, 31776-31788.
- Choi, H.J., and Weis, W.I. (2005). Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* 346, 367-376.
- Chung, J., Nguyen, A.K., Henstridge, D.C., Holmes, A.G., Chan, M.H., Mesa, J.L., Lancaster, G.I., Southgate, R.J., Bruce, C.R., Duffy, S.J., *et al.* (2008). HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1739-1744.
- Clarke, M.S., Caldwell, R.W., Chiao, H., Miyake, K., and McNeil, P.L. (1995). Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ Res* 76, 927-934.
- Cohn, R.D., and Campbell, K.P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23, 1456-1471.
- Corrado, D., Basso, C., Schiavon, M., and Thiene, G. (1998). Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med* 339, 364-369.
- Corrado, D., Fontaine, G., Marcus, F.I., McKenna, W.J., Nava, A., Thiene, G., and Wichter, T. (2000). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: need for an international registry. Study Group on Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy of the Working Groups on Myocardial and Pericardial Disease and Arrhythmias of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the World Heart Federation. *Circulation* 101, E101-106.
- Corrado, D., Thiene, G., Nava, A., Rossi, L., and Pennelli, N. (1990). Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases. *Am J Med* 89, 588-596.
- Cowin, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., Tamkun, J., and Hynes, R.O. (1986). Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 46, 1063-1073.
- Cox, M.G., van der Zwaag, P.A., van der Werf, C., van der Smagt, J.J., Noorman, M., Bhuiyan, Z.A., Wiesfeld, A.C., Volders, P.G., van Langen, I.M., Atsma, D.E., *et al.* (2011). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: pathogenic desmosome mutations in index-patients predict outcome of family screening: Dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy genotype-phenotype follow-up study. *Circulation* 123, 2690-2700.
- Dalal, D., Nasir, K., Bomma, C., Prakasa, K., Tandri, H., Piccini, J., Roguin, A., Tichnell, C., James, C., Russell, S.D., *et al.* (2005). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a United States experience. *Circulation* 112, 3823-3832.

- Delva, E., Tucker, D.K., and Kowalczyk, A.P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002543.
- den Haan, A.D., Tan, B.Y., Zikusoka, M.N., Llado, L.I., Jain, R., Daly, A., Tichnell, C., James, C., Amat-Alarcon, N., Abraham, T., *et al.* (2009). Comprehensive desmosome mutation analysis in north americans with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 428-435.
- Dubash, A.D., and Green, K.J. (2011). Desmosomes. *Curr Biol* 21, R529-531.
- Erken, H., Yariz, K.O., Duman, D., Kaya, C.T., Sayin, T., Heper, A.O., and Tekin, M. (2011). Cardiomyopathy with alopecia and palmoplantar keratoderma (CAPK) is caused by a JUP mutation. *Br J Dermatol* 165, 917-921.
- Ersoy-Evans, S., Erkin, G., Fassihi, H., Chan, I., Paller, A.S., Surucu, S., and McGrath, J.A. (2006). Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome resulting from a new homozygous mutation, 888delC, in the desmosomal protein plakophilin 1. *J Am Acad Dermatol* 55, 157-161.
- Eshkind, L., Tian, Q., Schmidt, A., Franke, W.W., Windoffer, R., and Leube, R.E. (2002). Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol* 81, 592-598.
- Fishbein, M.C., Siegel, R.J., Thompson, C.E., and Hopkins, L.C. (1993). Sudden death of a carrier of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Ann Intern Med* 119, 900-905.
- Fontao, L., Favre, B., Riou, S., Geerts, D., Jaunin, F., Saurat, J.H., Green, K.J., Sonnenberg, A., and Borradori, L. (2003). Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and desmoplakin with intermediate filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus. *Mol Biol Cell* 14, 1978-1992.
- Frank, R., Fontaine, G., Vedel, J., Mialet, G., Sol, C., Guiraudon, G., and Grosogeat, Y. (1978). [Electrocardiology of 4 cases of right ventricular dysplasia inducing arrhythmia]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 71, 963-972.
- Franke, W.W., Borrmann, C.M., Grund, C., and Pieperhoff, S. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol* 85, 69-82.
- Franke, W.W., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R., Mueller, H.M., Schiller, D.L., and Cowin, P. (1989). Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4027-4031.
- Fuchs, E., and Cleveland, D.W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.
- Furlanello, F., Bertoldi, A., Dallago, M., Furlanello, C., Fernando, F., Inama, G., Pappone, C., and Chierchia, S. (1998). Cardiac arrest and sudden death in competitive athletes with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Pacing Clin Electrophysiol* 21, 331-335.
- Gallicano, G.I., Bauer, C., and Fuchs, E. (2001). Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development* 128, 929-941.
- Gallicano, G.I., Kouklis, P., Bauer, C., Yin, M., Vasioukhin, V., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998). Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol* 143, 2009-2022.

- Gandjbakhch, E., Charron, P., Fressart, V., Lorin de la Grandmaison, G., Simon, F., Gary, F., Vite, A., Hainque, B., Hidden-Lucet, F., Komajda, M., *et al.* (2011). Plakophilin 2A is the dominant isoform in human heart tissue: consequences for the genetic screening of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart* 97, 844-849.
- Garcia-Gras, E., Lombardi, R., Giocondo, M.J., Willerson, J.T., Schneider, M.D., Khoury, D.S., and Marian, A.J. (2006). Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 116, 2012-2021.
- Gardner, D.G., Chen, S., Glenn, D.J., and Grigsby, C.L. (2007). Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension* 49, 419-426.
- Garrod, D., and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 1778, 572-587.
- Garrod, D.R., Berika, M.Y., Bardsley, W.F., Holmes, D., and Taberner, L. (2005). Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci* 118, 5743-5754.
- Gee, S.H., Madhavan, R., Levinson, S.R., Caldwell, J.H., Sealock, R., and Froehner, S.C. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* 18, 128-137.
- Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C.T., McDermott, D.A., Lerman, B.B., Markowitz, S.M., Ellinor, P.T., MacRae, C.A., *et al.* (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 36, 1162-1164.
- Getsios, S., Huen, A.C., and Green, K.J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 271-281.
- Godsel, L.M., Hsieh, S.N., Amargo, E.V., Bass, A.E., Pascoe-McGillicuddy, L.T., Huen, A.C., Thorne, M.E., Gaudry, C.A., Park, J.K., Myung, K., *et al.* (2005). Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol* 171, 1045-1059.
- Goldfarb, L.G., and Dalakas, M.C. (2009). Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest* 119, 1806-1813.
- Golenhofen, N., Ness, W., Koob, R., Htun, P., Schaper, W., and Drenckhahn, D. (1998). Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein alpha B-crystallin to Z lines of myocardium. *Am J Physiol* 274, H1457-1464.
- Green, K.J., and Gaudry, C.A. (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 208-216.
- Green, K.J., Getsios, S., Troyanovsky, S., and Godsel, L.M. (2010). Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000125.
- Green, K.J., and Simpson, C.L. (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127, 2499-2515.
- Grossmann, K.S., Grund, C., Huelsken, J., Behrend, M., Erdmann, B., Franke, W.W., and Birchmeier, W. (2004). Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol* 167, 149-160.

- Grounds, M.D., Radley, H.G., Lynch, G.S., Nagaraju, K., and De Luca, A. (2008). Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 31, 1-19.
- Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F., and Voellmy, R. (2001). Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J Biol Chem* 276, 45791-45799.
- Hamid, M.S., Norman, M., Quraishi, A., Firoozi, S., Thaman, R., Gimeno, J.R., Sachdev, B., Rowland, E., Elliott, P.M., and McKenna, W.J. (2002). Prospective evaluation of relatives for familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia reveals a need to broaden diagnostic criteria. *J Am Coll Cardiol* 40, 1445-1450.
- Han, R., Bansal, D., Miyake, K., Muniz, V.P., Weiss, R.M., McNeil, P.L., and Campbell, K.P. (2007). Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J Clin Invest* 117, 1805-1813.
- Han, R., and Campbell, K.P. (2007). Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr Opin Cell Biol* 19, 409-416.
- Hanakawa, Y., Schechter, N.M., Lin, C., Garza, L., Li, H., Yamaguchi, T., Fudaba, Y., Nishifuji, K., Sugai, M., Amagai, M., *et al.* (2002). Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest* 110, 53-60.
- Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122, 159-163.
- Hatzfeld, M. (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta* 1773, 69-77.
- Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K., and Vinzens, U. (2000). The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* 149, 209-222.
- Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y., and Schaper, J. (2000). The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res* 45, 273-278.
- Heuser, A., Plovie, E.R., Ellinor, P.T., Grossmann, K.S., Shin, J.T., Wichter, T., Basson, C.T., Lerman, B.B., Sasse-Klaassen, S., Thierfelder, L., *et al.* (2006). Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 79, 1081-1088.
- Ho, M., Post, C.M., Donahue, L.R., Lidov, H.G., Bronson, R.T., Goolsby, H., Watkins, S.C., Cox, G.A., and Brown, R.H., Jr. (2004). Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet* 13, 1999-2010.
- Hogan, A., Shepherd, L., Chabot, J., Quenneville, S., Prescott, S.M., Topham, M.K., and Gee, S.H. (2001). Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem* 276, 26526-26533.
- Holthofer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., and Leube, R.E. (2007). Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 264, 65-163.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-295.
- Huelsken, J., and Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115, 3977-3978.

- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148, 567-578.
- Ishii, K., Amagai, M., Hall, R.P., Hashimoto, T., Takayanagi, A., Gamou, S., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1997). Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 159, 2010-2017.
- Izumo, S., Lompre, A.M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1987). Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 79, 970-977.
- Jacoby, D., and McKenna, W.J. (2012). Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J* 33, 296-304.
- Jefferson, J.J., Ciatto, C., Shapiro, L., and Liem, R.K. (2007). Structural analysis of the plakin domain of bullous pemphigoid antigen 1 (BPAG1) suggests that plakins are members of the spectrin superfamily. *J Mol Biol* 366, 244-257.
- Jefferson, J.J., Leung, C.L., and Liem, R.K. (2004). Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 542-553.
- Jonkman, M.F., Pasmooij, A.M., Pasmans, S.G., van den Berg, M.P., Ter Horst, H.J., Timmer, A., and Pas, H.H. (2005). Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 77, 653-660.
- Kami, K., Chidgey, M., Dafforn, T., and Overduin, M. (2009). The desmoglein-specific cytoplasmic region is intrinsically disordered in solution and interacts with multiple desmosomal protein partners. *J Mol Biol* 386, 531-543.
- Kemi, O.J., Ceci, M., Wisloff, U., Grimaldi, S., Gallo, P., Smith, G.L., Condorelli, G., and Ellingsen, O. (2008). Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol* 214, 316-321.
- Kljuic, A., Gilead, L., Martinez-Mir, A., Frank, J., Christiano, A.M., and Zlotogorski, A. (2003). A nonsense mutation in the desmoglein 1 gene underlies striate keratoderma. *Exp Dermatol* 12, 523-527.
- Koeser, J., Troyanovsky, S.M., Grund, C., and Franke, W.W. (2003). De novo formation of desmosomes in cultured cells upon transfection of genes encoding specific desmosomal components. *Exp Cell Res* 285, 114-130.
- Kostenko, S., and Moens, U. (2009). Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci* 66, 3289-3307.
- Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V.A., Patel, V.V., Molkentin, J.D., and Radice, G.L. (2005). Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res* 96, 346-354.
- Kowalczyk, A.P., Bornslaeger, E.A., Borgwardt, J.E., Palka, H.L., Dhaliwal, A.S., Corcoran, C.M., Denning, M.F., and Green, K.J. (1997). The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol* 139, 773-784.
- Kresh, J.Y., and Chopra, A. (2011). Intercellular and extracellular mechanotransduction in cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 462, 75-87.

- Krusche, C.A., Holthofer, B., Hofe, V., van de Sandt, A.M., Eshkind, L., Bockamp, E., Merx, M.W., Kant, S., Windoffer, R., and Leube, R.E. (2011). Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation. *Basic Res Cardiol* *106*, 617-633.
- Kumarapeli, A.R., and Wang, X. (2004). Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol* *37*, 1097-1109.
- Lapidos, K.A., Kakkar, R., and McNally, E.M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* *94*, 1023-1031.
- Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* *283*, 249-256.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2007). Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J Cell Biol* *176*, 147-154.
- Li, D., Ahmad, F., Gardner, M.J., Weilbaecher, D., Hill, R., Karibe, A., Gonzalez, O., Tapscott, T., Sharratt, G.P., Bachinski, L.L., *et al.* (2000). The locus of a novel gene responsible for arrhythmogenic right-ventricular dysplasia characterized by early onset and high penetrance maps to chromosome 10p12-p14. *Am J Hum Genet* *66*, 148-156.
- Li, D., Liu, Y., Maruyama, M., Zhu, W., Chen, H., Zhang, W., Reuter, S., Lin, S.F., Haneline, L.S., Field, L.J., *et al.* (2011a). Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* *20*, 4582-4596.
- Li, J., Swope, D., Raess, N., Cheng, L., Muller, E.J., and Radice, G.L. (2011b). Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of {beta}-catenin signaling. *Mol Cell Biol* *31*, 1134-1144.
- Lin, K.M., Lin, B., Lian, I.Y., Mestrl, R., Scheffler, I.E., and Dillmann, W.H. (2001). Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation* *103*, 1787-1792.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* *13*, 476-484.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Lombardi, R., Dong, J., Rodriguez, G., Bell, A., Leung, T.K., Schwartz, R.J., Willerson, J.T., Brugada, R., and Marian, A.J. (2009). Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res* *104*, 1076-1084.
- London, B. (2001). Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* *12*, 1089-1091.
- Mahdavi, V., Lompre, A.M., Chambers, A.P., and Nadal-Ginard, B. (1984). Cardiac myosin heavy chain isozymic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability. *Eur Heart J* *5 Suppl F*, 181-191.
- Marber, M.S., Mestrl, R., Chi, S.H., Sayen, M.R., Yellon, D.M., and Dillmann, W.H. (1995). Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* *95*, 1446-1456.

- Marcus, F.I., and Abidov, A. (2012). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy 2012: Diagnostic Challenges and Treatment. *J Cardiovasc Electrophysiol*.
- Marcus, F.I., Fontaine, G.H., Guiraudon, G., Frank, R., Laurenceau, J.L., Malergue, C., and Grosogeat, Y. (1982). Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation* 65, 384-398.
- Marcus, F.I., McKenna, W.J., Sherrill, D., Basso, C., Bauce, B., Bluemke, D.A., Calkins, H., Corrado, D., Cox, M.G., Daubert, J.P., *et al.* (2010). Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation* 121, 1533-1541.
- Marcus, F.I., Zareba, W., Calkins, H., Towbin, J.A., Basso, C., Bluemke, D.A., Estes, N.A., 3rd, Picard, M.H., Sanborn, D., Thiene, G., *et al.* (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia clinical presentation and diagnostic evaluation: results from the North American Multidisciplinary Study. *Heart Rhythm* 6, 984-992.
- Martin, J.L., Mestral, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L.L., and Dillmann, W.H. (1997). Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 96, 4343-4348.
- McKenna, W.J., Thiene, G., Nava, A., Fontaliran, F., Blomstrom-Lundqvist, C., Fontaine, G., and Camerini, F. (1994). Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J* 71, 215-218.
- McKoy, G., Protonotarios, N., Crosby, A., Tsatsopoulou, A., Anastasakis, A., Coonar, A., Norman, M., Baboonian, C., Jeffery, S., and McKenna, W.J. (2000). Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 355, 2119-2124.
- Melacini, P., Fanin, M., Danieli, G.A., Villanova, C., Martinello, F., Miorin, M., Freda, M.P., Miorelli, M., Mostacciuolo, M.L., Fasoli, G., *et al.* (1996). Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation* 94, 3168-3175.
- Melberg, A., Oldfors, A., Blomstrom-Lundqvist, C., Stalberg, E., Carlsson, B., Larrson, E., Lidell, C., Eeg-Olofsson, K.E., Wikstrom, G., Henriksson, G., *et al.* (1999). Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q. *Ann Neurol* 46, 684-692.
- Merner, N.D., Hodgkinson, K.A., Haywood, A.F., Connors, S., French, V.M., Drenckhahn, J.D., Kupprion, C., Ramadanova, K., Thierfelder, L., McKenna, W., *et al.* (2008). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet* 82, 809-821.
- Mertens, C., Hofmann, I., Wang, Z., Teichmann, M., Sepehri Chong, S., Schnolzer, M., and Franke, W.W. (2001). Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7795-7800.
- Mertens, C., Kuhn, C., and Franke, W.W. (1996). Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol* 135, 1009-1025.
- Mese, G., Richard, G., and White, T.W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2516-2524.
- Milner, D.J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., and Capetanaki, Y. (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* 134, 1255-1270.

- Morrison, L.E., Hoover, H.E., Thuerauf, D.J., and Glembotski, C.C. (2003). Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ Res* 92, 203-211.
- Moses, K.A., DeMayo, F., Braun, R.M., Reecy, J.L., and Schwartz, R.J. (2001). Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice. *Genesis* 31, 176-180.
- Muller, J., Ritt, D.A., Copeland, T.D., and Morrison, D.K. (2003). Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J* 22, 4431-4442.
- Murray, B. (2012). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy (ARVD/C): a review of molecular and clinical literature. *J Genet Couns* 21, 494-504.
- Myers, R.S., and Stahl, F.W. (1994). Chi and the RecBC D enzyme of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 28, 49-70.
- Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul* 1, 37-44.
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S., and Yeh, Y.H. (2007). Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87, 425-456.
- Nava, A., Bauce, B., Basso, C., Muriago, M., Rampazzo, A., Villanova, C., Daliento, L., Buja, G., Corrado, D., Danieli, G.A., *et al.* (2000). Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 36, 2226-2233.
- Nekrasova, O.E., Amargo, E.V., Smith, W.O., Chen, J., Kreitzer, G.E., and Green, K.J. (2011). Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *J Cell Biol* 195, 1185-1203.
- Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525-2532.
- Nigro, G., Comi, L.I., Politano, L., and Bain, R.J. (1990). The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol* 26, 271-277.
- Nishifuji, K., Sugai, M., and Amagai, M. (2008). Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci* 49, 21-31.
- Norgett, E.E., Hatsell, S.J., Carvajal-Huerta, L., Cabezas, J.C., Common, J., Purkis, P.E., Whittock, N., Leigh, I.M., Stevens, H.P., and Kelsell, D.P. (2000). Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 9, 2761-2766.
- O'Keefe, E.J., Erickson, H.P., and Bennett, V. (1989). Desmoplakin I and desmoplakin II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 264, 8310-8318.
- O'Neill, A., Williams, M.W., Resneck, W.G., Milner, D.J., Capetanaki, Y., and Bloch, R.J. (2002). Sarcolemmal organization in skeletal muscle lacking desmin: evidence for cytokeratins associated with the membrane skeleton at costameres. *Mol Biol Cell* 13, 2347-2359.
- Paffenholz, R., and Franke, W.W. (1997). Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* 61, 293-304.

- Pai, L.M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M., and Peifer, M. (1996). Drosophila alpha-catenin and E-cadherin bind to distinct regions of Drosophila Armadillo. *J Biol Chem* *271*, 32411-32420.
- Pankuweit, S., Richter, A., Ruppert, V., and Maisch, B. (2009). [Classification of cardiomyopathies and indication for endomyocardial biopsy revisited]. *Herz* *34*, 55-62.
- Park, H.S., Lee, J.S., Huh, S.H., Seo, J.S., and Choi, E.J. (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J* *20*, 446-456.
- Payne, A.S., Hanakawa, Y., Amagai, M., and Stanley, J.R. (2004). Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 536-543.
- Peifer, M., and Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell* *63*, 1167-1176.
- Pelouch, V., Dixon, I.M., Golfman, L., Beamish, R.E., and Dhalla, N.S. (1993). Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* *129*, 101-120.
- Peters, N.S., Green, C.R., Poole-Wilson, P.A., and Severs, N.J. (1993). Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation* *88*, 864-875.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3710-3714.
- Pieperhoff, S., Barth, M., Rickelt, S., and Franke, W.W. (2010). Desmosomal molecules in and out of adhering junctions: normal and diseased States of epidermal, cardiac and mesenchymally derived cells. *Dermatol Res Pract* *2010*, 139167.
- Pieperhoff, S., and Franke, W.W. (2007). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development. *Eur J Cell Biol* *86*, 377-391.
- Pigors, M., Kiritsi, D., Krumpelmann, S., Wagner, N., He, Y., Podda, M., Kohlhase, J., Hausser, I., Bruckner-Tuderman, L., and Has, C. (2011). Lack of plakoglobin leads to lethal congenital epidermolysis bullosa: a novel clinico-genetic entity. *Hum Mol Genet* *20*, 1811-1819.
- Pilichou, K., Nava, A., Basso, C., Beffagna, G., Bauce, B., Lorenzon, A., Frigo, G., Vettori, A., Valente, M., Towbin, J., *et al.* (2006). Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* *113*, 1171-1179.
- Pilichou, K., Remme, C.A., Basso, C., Campian, M.E., Rizzo, S., Barnett, P., Scicluna, B.P., Bauce, B., van den Hoff, M.J., de Bakker, J.M., *et al.* (2009). Myocyte necrosis underlies progressive myocardial dystrophy in mouse *dsg2*-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Exp Med* *206*, 1787-1802.
- Poteete, A.R. (2001). What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett* *201*, 9-14.
- Prins, K.W., Humston, J.L., Mehta, A., Tate, V., Ralston, E., and Ervasti, J.M. (2009). Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol* *186*, 363-369.
- Protonotarios, N., Anastasakis, A., Antoniadis, L., Chlouverakis, G., Syrris, P., Basso, C., Asimaki, A., Theopistou, A., Stefanadis, C., Thiene, G., *et al.* (2011). Arrhythmogenic right ventricular

cardiomyopathy/dysplasia on the basis of the revised diagnostic criteria in affected families with desmosomal mutations. *Eur Heart J* 32, 1097-1104.

Quarta, G., Muir, A., Pantazis, A., Syrris, P., Gehmlich, K., Garcia-Pavia, P., Ward, D., Sen-Chowdhry, S., Elliott, P.M., and McKenna, W.J. (2011). Familial evaluation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: impact of genetics and revised task force criteria. *Circulation* 123, 2701-2709.

Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J.D., Wims, M., Zheng, H., and Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem* 201, 331-335.

Rampazzo, A., Nava, A., Danieli, G.A., Buja, G., Daliento, L., Fasoli, G., Scognamiglio, R., Corrado, D., and Thiene, G. (1994). The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Hum Mol Genet* 3, 959-962.

Rampazzo, A., Nava, A., Erne, P., Eberhard, M., Vian, E., Slomp, P., Tiso, N., Thiene, G., and Danieli, G.A. (1995). A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet* 4, 2151-2154.

Rampazzo, A., Nava, A., Malacrida, S., Beffagna, G., Bauce, B., Rossi, V., Zimbello, R., Simionati, B., Basso, C., Thiene, G., *et al.* (2002). Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 71, 1200-1206.

Ray, P.S., Martin, J.L., Swanson, E.A., Otani, H., Dillmann, W.H., and Das, D.K. (2001). Transgene overexpression of alphaB crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J* 15, 393-402.

Richter, K., and Buchner, J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188, 281-290.

Rickman, L., Simrak, D., Stevens, H.P., Hunt, D.M., King, I.A., Bryant, S.P., Eady, R.A., Leigh, I.M., Arnemann, J., Magee, A.I., *et al.* (1999). N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 8, 971-976.

Rizzo, S., Lodder, E.M., Verkerk, A.O., Wolswinkel, R., Beekman, L., Pilichou, K., Basso, C., Remme, C.A., Thiene, G., and Bezzina, C.R. (2012). Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovasc Res* 95, 409-418.

Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25, 139-140.

Ruiz, P., Brinkmann, V., Ledermann, B., Behrend, M., Grund, C., Thalhammer, C., Vogel, F., Birchmeier, C., Gunthert, U., Franke, W.W., *et al.* (1996). Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* 135, 215-225.

Saguner, A.M., Brunckhorst, C., Duru, F. (2011). Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie/Kardiomyopathie *Cardiovascular Medicine* 14, 303-314.

Sakanaka, C. (2002). Phosphorylation and regulation of beta-catenin by casein kinase I epsilon. *J Biochem* 132, 697-703.

- Sato, P.Y., Coombs, W., Lin, X., Nekrasova, O., Green, K.J., Isom, L.L., Taffet, S.M., and Delmar, M. (2011). Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res* *109*, 193-201.
- Sato, P.Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patino, G.A., Taffet, S.M., Isom, L.L., and Delmar, M. (2009). Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res* *105*, 523-526.
- Schmidt, A., Langbein, L., Pratzel, S., Rode, M., Rackwitz, H.R., and Franke, W.W. (1999). Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* *64*, 291-306.
- Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Pratzel, S., Zimbelmann, R., and Franke, W.W. (1997). Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res* *290*, 481-499.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* *23*, 5080-5081.
- Sen-Chowdhry, S., Morgan, R.D., Chambers, J.C., and McKenna, W.J. (2010a). Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med* *61*, 233-253.
- Sen-Chowdhry, S., Syrris, P., and McKenna, W.J. (2005). Genetics of right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol* *16*, 927-935.
- Sen-Chowdhry, S., Syrris, P., Pantazis, A., Quarta, G., McKenna, W.J., and Chambers, J.C. (2010b). Mutational heterogeneity, modifier genes, and environmental influences contribute to phenotypic diversity of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* *3*, 323-330.
- Senf, S.M., Dodd, S.L., McClung, J.M., and Judge, A.R. (2008). Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J* *22*, 3836-3845.
- Severini, G.M., Krajcinovic, M., Pinamonti, B., Sinagra, G., Fioretti, P., Brunazzi, M.C., Falaschi, A., Camerini, F., Giacca, M., and Mestroni, L. (1996). A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14. *Genomics* *31*, 193-200.
- Severs, N.J., Bruce, A.F., Dupont, E., and Rothery, S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* *80*, 9-19.
- Shirakata, Y., Amagai, M., Hanakawa, Y., Nishikawa, T., and Hashimoto, K. (1998). Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. *J Invest Dermatol* *110*, 76-78.
- Simpson, M.A., Mansour, S., Ahnood, D., Kalidas, K., Patton, M.A., McKenna, W.J., Behr, E.R., and Crosby, A.H. (2009). Homozygous mutation of desmocollin-2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with mild palmoplantar keratoderma and woolly hair. *Cardiology* *113*, 28-34.
- Sinha, B., Koster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Vedio, B., Johannes, L., *et al.* (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* *144*, 402-413.
- Smith, W. (2011). Guidelines for the diagnosis and management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Lung Circ* *20*, 757-760.

- Sohal, D.S., Nghiem, M., Crackower, M.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Tymitz, K.M., Penninger, J.M., and Molkenkin, J.D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* 89, 20-25.
- Sonnenberg, A., and Liem, R.K. (2007). Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* 313, 2189-2203.
- Stanley, E.G., Biben, C., Elefanty, A., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L., and Harvey, R.P. (2002). Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene *Nkx2-5*. *Int J Dev Biol* 46, 431-439.
- Stappenbeck, T.S., Lamb, J.A., Corcoran, C.M., and Green, K.J. (1994). Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *J Biol Chem* 269, 29351-29354.
- Steinfeld, R., Reinhardt, K., Schreiber, K., Hillebrand, M., Kraetzner, R., Bruck, W., Saftig, P., and Gartner, J. (2006). Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. *Am J Hum Genet* 78, 988-998.
- Stephanou, A., Brar, B., Heads, R., Knight, R.D., Marber, M.S., Pennica, D., and Latchman, D.S. (1998). Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli. *J Mol Cell Cardiol* 30, 849-855.
- Stone, M.R., O'Neill, A., Catino, D., and Bloch, R.J. (2005). Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol Biol Cell* 16, 4280-4293.
- Su, C.Y., Chong, K.Y., Chen, J., Ryter, S., Khardori, R., and Lai, C.C. (1999). A physiologically relevant hyperthermia selectively activates constitutive hsp70 in H9c2 cardiac myoblasts and confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol* 31, 845-855.
- Su, C.Y., Chong, K.Y., Owen, O.E., Dillmann, W.H., Chang, C., and Lai, C.C. (1998). Constitutive and inducible hsp70s are involved in oxidative resistance evoked by heat shock or ethanol. *J Mol Cell Cardiol* 30, 587-598.
- Sussman, M.A., Volkers, M., Fischer, K., Bailey, B., Cottage, C.T., Din, S., Gude, N., Avitabile, D., Alvarez, R., Sundararaman, B., *et al.* (2011). Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev* 91, 1023-1070.
- Swope, D., Li, J., Muller, E.J., and Radice, G.L. (2012). Analysis of a *Jup* hypomorphic allele reveals a critical threshold for postnatal viability. *Genesis*.
- Syed, S.E., Trinnaman, B., Martin, S., Major, S., Hutchinson, J., and Magee, A.I. (2002). Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J* 362, 317-327.
- Syrris, P., Ward, D., Evans, A., Asimaki, A., Gandjbakhch, E., Sen-Chowdhry, S., and McKenna, W.J. (2006). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene *desmocollin-2*. *Am J Hum Genet* 79, 978-984.
- Tabib, A., Loire, R., Chalabreysse, L., Meyronnet, D., Miras, A., Malicier, D., Thivolet, F., Chevalier, P., and Bouvagnet, P. (2003). Circumstances of death and gross and microscopic observations in a series of 200 cases of sudden death associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and/or dysplasia. *Circulation* 108, 3000-3005.
- Tagawa, H., Wang, N., Narishige, T., Ingber, D.E., Zile, M.R., and Cooper, G.t. (1997). Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circ Res* 80, 281-289.

- Taylor, M., Graw, S., Sinagra, G., Barnes, C., Slavov, D., Brun, F., Pinamonti, B., Salcedo, E.E., Sauer, W., Pyxaras, S., *et al.* (2011). Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation* 124, 876-885.
- Thiene, G., Corrado, D., Nava, A., Rossi, L., Poletti, A., Boffa, G.M., Daliento, L., and Pennelli, N. (1991). Right ventricular cardiomyopathy: is there evidence of an inflammatory aetiology? *Eur Heart J* 12 Suppl D, 22-25.
- Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L., and Pennelli, N. (1988). Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 318, 129-133.
- Thomason, H.A., Scothern, A., McHarg, S., and Garrod, D.R. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J* 429, 419-433.
- Thornell, L., Carlsson, L., Li, Z., Mericskay, M., and Paulin, D. (1997). Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2107-2124.
- Tiso, N., Stephan, D.A., Nava, A., Bagattin, A., Devaney, J.M., Stanchi, F., Larderet, G., Brahmabhatt, B., Brown, K., Bauce, B., *et al.* (2001). Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 10, 189-194.
- Troyanovsky, S.M., Eshkind, L.G., Troyanovsky, R.B., Leube, R.E., and Franke, W.W. (1993). Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell* 72, 561-574.
- Troyanovsky, S.M., Guelstein, V.I., Tchipysheva, T.A., Krutovskikh, V.A., and Bannikov, G.A. (1989). Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J Cell Sci* 93 ( Pt 3), 419-426.
- Van Erp, C., Loch, D., Laws, N., Trebbin, A., and Hoey, A.J. (2010). Timeline of cardiac dystrophy in 3-18-month-old MDX mice. *Muscle Nerve* 42, 504-513.
- van Tintelen, J.P., Van Gelder, I.C., Asimaki, A., Suurmeijer, A.J., Wiesfeld, A.C., Jongbloed, J.D., van den Wijngaard, A., Kuks, J.B., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., Notermans, N., *et al.* (2009). Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm* 6, 1574-1583.
- Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L., and Fuchs, E. (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 3, 1076-1085.
- Vilela, M.J., Hashimoto, T., Nishikawa, T., North, A.J., and Garrod, D. (1995). A simple epithelial cell line (MDCK) shows heterogeneity of desmoglein isoforms, one resembling pemphigus vulgaris antigen. *J Cell Sci* 108 ( Pt 4), 1743-1750.
- Weber, K.T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13, 1637-1652.
- Whittock, N.V. (2003). Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six distinct genes: characterization of mouse DSG4, DSG5, and DSG6. *J Invest Dermatol* 120, 970-980.
- Whittock, N.V., Wan, H., Morley, S.M., Garzon, M.C., Kristal, L., Hyde, P., McLean, W.H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Christiano, A.M., *et al.* (2002). Compound heterozygosity for non-sense and mis-sense mutations in desmoplakin underlies skin fragility/woolly hair syndrome. *J Invest Dermatol* 118, 232-238.

Wickstrom, S.A., Lange, A., Montanez, E., and Fassler, R. (2010). The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *EMBO J* 29, 281-291.

Witcher, L.L., Collins, R., Puttagunta, S., Mechanic, S.E., Munson, M., Gumbiner, B., and Cowin, P. (1996). Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J Biol Chem* 271, 10904-10909.

Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Court, D.L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5978-5983.

## 8. Anhang

	Dsp <sup>+/+</sup> -d0	Dsp <sup>-/-</sup> -d7	Dsp <sup>-/-</sup> -d14	Dsp <sup>-/-</sup> -d21
HF [bpm]	517±23	556±17	521±22	565±10
IVS [mm]	1,06±0,03	1,09±0,05	1,00±0,05	1,00±0,09
LVPW [mm]	0,72±0,02	0,81±0,02	0,77±0,02	0,80±0,04
LV [mm]	4,21±0,14	4,82±0,14	5,03±0,15**	5,11±0,19**
FS [%]	25,94±2,97	14,34±2,34*	15,93±1,30*	15,61±2,67*
EF [%]	51,00±4,74	29,96±4,56**	34,99±2,88**	29,88±1,68*
SV [µl]	26,36±2,40	24,45±2,87	27,07±2,69	21,80±2,63*
HZV [ml/min]	13,45±1,03	13,74±1,74	14,08±1,50	10,98±1,03**

**Tabelle Anhang 1: Parameter der echokardiographischen Untersuchung der Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse.** Ermittelte Parameter (Mittelwert ± Standardfehler) der Dsp<sup>+/+</sup>-Mäuse (d0) und der Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse an d7, d14 und d21 (n=6). Herzfrequenz (HF), Durchmesser des interventrikulären Septums (IVS), Durchmesser der linksventrikulären posterioren Wand (LVPW), Durchmesser der linken Ventrikels (LV), Fraktionelle Faserverkürzung (FS), Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV), Herzzeitvolumen (HZV). Statistik: Anova-Varianzanalysetest (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

Genname	Abkürzung	Expression
A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	Adamts1	4,29±0,36***
A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	Adamts2	4,67±1,14**
A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	Adamts5	1,31±0,02**
A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	Adamts8	2,07±0,08**
Catenin (cadherin associated protein), alpha 1	Ctnna1	1,11±0,15
Catenin (cadherin associated protein), alpha 2	Ctnna2	1,31±0,02
Catenin (cadherin associated protein), beta 1	Ctnnb1	1,85±0,33
CD44 antigen	Cd44	2,06±0,15**
Cadherin 1	Cdh1	1,17±0,01
Cadherin 2	Cdh2	1,25±0,27
Cadherin 3	Cdh3	1,31±0,05

Cadherin 4	Cdh4	1,01±0,74
Contactin 1	Cntn1	1,76±0,13
Collagen, type I, alpha 1	Col1a1	22,36±13,28**
Collagen, type II, alpha 1	Col2a1	1,00±0,02
Collagen, type III, alpha 1	Col3a1	267,99±32,84
Collagen, type IV, alpha 1	Col4a1	2,32±0,58**
Collagen, type IV, alpha 2	Col4a2	1,62±0,51*
Collagen, type IV, alpha 3	Col4a3	3,51±0,12**
Collagen, type V, alpha 1	Col5a1	5,8±1,21**
Collagen, type VI, alpha 1	Col6a1	2,75±0,79**
Versican	Vcan	4,48±0,42**
Connective tissue growth factor	Ctgf	3,08±1,04**
Extracellular matrix protein 1	Ecm1	1,75±0,10***
Elastin microfibril interfacier 1	Emilin1	2,38±0,40**
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Entpd1	1,39±0,04**
Fibulin 1	Fbln1	3,45±0,47***
Fibronectin 1	Fn1	10,3±1,67**
Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	Hapln1	1,31±0,02
Hemolytic complement	Hc	1,31±0,02
Intercellular adhesion molecule 1	Icam1	3,12±0,10***
Integrin alpha 2	Itga2	1,57±0,07
Integrin alpha 3	Itga3	1,67±0,09*
Integrin alpha 4	Itga4	2,30±0,03***
Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Itga5	1,61±0,15*
Integrin alpha E, epithelial-associated	Itgae	1,45±0,06
Integrin alpha L	Itgal	6,42±0,51*
Integrin alpha M	Itgam	5,48±0,14***
Integrin alpha V	Itgav	1,87±0,11***
Integrin alpha X	Itgax	2,48±0,19*
Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	Itgb1	1,65±0,18**

Integrin beta 2	Itgb2	1,94±0,09**
Integrin beta 3	Itgb3	3,33±0,11***
Integrin beta 4	Itgb4	1,20±0,01
Laminin, alpha 1	Lama1	1,18±0,02
Laminin, alpha 2	Lama2	1,49±0,27
Laminin, alpha 3	Lama3	1,27±0,11
Laminin, beta 2	Lamb2	1,06±0,47
Laminin, beta 3	Lamb3	1,98±0,09
Laminin, gamma 1	Lamc1	5,42±0,42***
Matrix metallopeptidase 10	Mmp10	1,31±0,02
Matrix metallopeptidase 11	Mmp11	1,11±0,03
Matrix metallopeptidase 12	Mmp12	1,07±0,02
Matrix metallopeptidase 13	Mmp13	1,41±0,01*
Matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	8,08±0,59***
Matrix metallopeptidase 15	Mmp15	2,40±0,25*
Matrix metallopeptidase 1a (interstitial collagenase)	Mmp1a	1,10±0,01
Matrix metallopeptidase 2	Mmp2	3,57±0,66***
Matrix metallopeptidase 3	Mmp3	1,03±0,67
Matrix metallopeptidase 7	Mmp7	1,12±0,26
Matrix metallopeptidase 8	Mmp8	3,75±0,01*
Matrix metallopeptidase 9	Mmp9	2,75±0,03***
Neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	7,73±0,54***
Neural cell adhesion molecule 2	Ncam2	1,31±0,02
Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Pecam1	1,20±0,06
Periostin, osteoblast specific factor	Postn	17,70±5,58*
Selectin, endothelial cell	Sele	2,88±0,13**
Selectin, lymphocyte	Sell	1,81±0,13*
Selectin, platelet	Selp	2,41±0,04***
Sarcoglycan, epsilon	Sgce	1,70±0,35
Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	Sparc	3,44±2,60

Sparc/osteonectin, cwcx and kazal-like domains proteoglycan1	Spock1	1,31±0,02
Secreted phosphoprotein 1	Spp1	67,04±8,29***
Synaptotagmin I	Syt1	1,02±0,02
Transforming growth factor, beta induced	Tgfb1	3,63±0,26***
Thrombospondin 1	Thbs1	1,03±0,33
Thrombospondin 2	Thbs2	1,66±0,12*
Thrombospondin 3	Thbs3	4,15±0,29***
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	1,29±0,02
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Timp2	2,34±0,21***
Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	5,38±0,34**
Tenascin C	Tnc	14,13±1,16**
Vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	2,77±0,59
Vitronectin	Vtn	1,08±0,01

**Tabelle Anhang 2: Ergebnisse des „Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Arrays“.** relative Expression (Mittelwert ± Standardfehler) der Dsp<sup>+/+</sup>-Mäuse und der Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse (n=5). Statistik: Anova-Varianzanalysestest (Vergleich zu Dsp<sup>+/+</sup>: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

	Dsp <sup>+/+</sup>	Dsp <sup>-/-</sup>	Dysf <sup>-/-</sup> -Dsp <sup>-/-</sup>
HF [bpm]	435±28	469±74	522±79
IVS [mm]	0,74±0,05	0,71±0,05	0,74±0,05
LVPW [mm]	0,73±0,01	0,71±0,02	0,73±0,02
LV [mm]	4,40±0,08	5,23±0,09**	4,60±0,08 <sup>#</sup>
FS [%]	23,37±1,72	10,44±0,77***	10,61±1,19***
EF [%]	47,33±3,48	22,75±1,49***	22,48±2,08***
SV [μl]	31,11±1,30	21,59±2,29**	14,89±1,11*** <sup>##</sup>
HZV [ml/min]	14,37±0,85	10,14±1,22*	7,69±0,54*** <sup>##</sup>

**Tabelle Anhang 3: Parameter der echokardiographischen Untersuchung der Dysf<sup>-/-</sup>/Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse.** Ermittelte Parameter (Mittelwert ± Standardfehler) der Dsp<sup>+/+</sup>-Mäuse und der Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse und der Dysf<sup>-/-</sup>/Dsp<sup>-/-</sup>-Mäuse 11 (n=6) Tage nach Beginn der Dsp-Deletion. Herzfrequenz (HF), Durchmesser des interventrikulären Septums (IVS), Durchmesser der linksventrikulären posterioren Wand (LVPW), Durchmesser des linken Ventrikels (LV), Fraktionelle Faserverkürzung (FS), Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV), Herzzeitvolumen (HZV). Statistik: Anova-Varianzanalysestest (Vergleich zu Dsp<sup>+/+</sup>: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001); (Vergleich zwischen Dsp<sup>-/-</sup> und Dysf<sup>-/-</sup>/Dsp<sup>-/-</sup>: # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001).

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad in Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
APS	Ammoniumpersulfat
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
b2m	beta-2-Mikrotubulin
BDM	2,3-Butadienon monoxime
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C <sub>T</sub> -Wert	Cycle of Threshold (Schwellenwert)
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cko	konditioneller Knockout
CMV	Cytomegalo-Virus
Cx43	Connexin-43
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol Hydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
Dsp	Desmoplakin

DTT	Dithiothreitol
E.x.x	Embryonaltag x,x
EBD	Evans Blue Dye
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EF	Ejektion Fraktion
EKG	Echokardiogramm
ECM	Extrazelluläre Matrix
ES	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
F-Primer	Forward Primer
FRT	Erkennungsstelle der Rekombinase Flippase
FS	Fractional Shortening
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GSK3	Glykogen Synthase Kinase
H <sub>2</sub> O	Wasser
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
ICD	implantierbarer Kardioverter- Defibrillator
IDP	innere intrazelluläre Plaque
IF	Intermediärfilamente
IgG	Immunoglobulin G
IVS	Interventrikuläres Septum
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
loxP	Erkennungsstelle für die Cre-Rekombinase

LV	Linker Ventrikel
LVPW	left ventricular posterior wall
M	mol/L
m	murin
mM	millimol/L
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Nkx/Nkx2.5	NK2 Homeobox 5
N-Cadherin	Neuronal-Cadherin
neg	negativ
Neo	Neomycin-Kassette
OD	optische Dichte
p	Phospho
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-bufferend Saline
PBST	Phosphate buffered saline tween
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pg	Plakoglobin
Pkp	Plakophilin
PM	Plasmamembran
pos	positiv
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
R-Primer	Reverse-Primer

RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-buffered Saline Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Massen pro Volumen
Wnt	wingless-Glycoprotein
WT	Wildtyp

**Tabelle 21: Abkürzungen**